



⑯ BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENT- UND  
MARKENAMT

⑰ Übersetzung der  
europäischen Patentschrift  
⑯ EP 0548 228 B1  
⑯ DE 691 29 988 T 2

⑯ Int. Cl. 6:  
C 12 N 9/20  
C 12 N 15/55  
C 11 D 3/386  
C 12 N 5/14

DE 691 29 988 T 2

⑯ Deutsches Aktenzeichen: 691 29 988.9  
⑯ PCT-Aktenzeichen: PCT/DK91/00271  
⑯ Europäisches Aktenzeichen: 91 916 986.2  
⑯ PCT-Veröffentlichungs-Nr.: WO 92/05249  
⑯ PCT-Anmeldestag: 13. 9. 91  
⑯ Veröffentlichungstag der PCT-Anmeldung: 2. 4. 92  
⑯ Erstveröffentlichung durch das EPA: 30. 6. 93  
⑯ Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA: 12. 8. 98  
⑯ Veröffentlichungstag im Patentblatt: 18. 3. 99

⑯ Unionspriorität:	⑯ Erfinder:
219490 13. 09. 90 DK	SVENDSEN, Allan, DK-3460 Birkeroed, DK;
219590 13. 09. 90 DK	CLAUSEN, Ib, Groth, DK-2920 Charlottenlund, DK;
219690 13. 09. 90 DK	PATKAR, Shamkant, Anant, DK-2800 Lyngby, DK;
⑯ Patentinhaber:	GORMSEN, Erik, DK-2830 Virum, DK
Novo Nordisk A/S, Bagsvaerd, DK	
⑯ Vertreter:	
Patent- und Rechtsanwälte Bardehle, Pagenberg, Dost, Altenburg, Geissler, Isenbruck, 81679 München	
⑯ Benannte Vertragstaaten:	
AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IT, LI, LU, NL, SE	

⑯ LIPASE-VARIANTEN

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingereicht, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

DE 691 29 988 T 2

**Gebiet der Erfindung**

Die vorliegende Erfindung betrifft neuartige Lipase-Enzymvarianten mit verbesserten Eigenschaften, für die Expression dieser Varianten kodierende DNA-Konstrukte, zur Expression der Varianten aus den DNA-Konstrukten befähigte Wirtszellen sowie ein Verfahren zur Erzeugung der Varianten durch Züchtung der Wirtszellen.

**Hintergrund der Erfindung**

Die Einführung und die Entwicklung von rekombinanten DNA-Techniken hatten einen starken Einfluß auf dem Gebiet der Proteinchemie. Aufgrund dieser Technik kommt es in Betracht, Peptide und Proteine, wie Enzyme, gemäß speziellen Kriterien zu konzipieren, was die Herstellung von Verbindungen mit erwünschten Eigenschaften erlaubt.

Aufgrund der Verfügbarkeit dieser Techniken wurde es möglich, Enzyme mit erwünschten Aminosäuresequenzen zu konstruieren. Diesem Ziel wurden erhebliche Forschungsanstrengungen gewidmet.

Die Primärstruktur einer Anzahl von Lipasen wurde bestimmt und in der Literatur beschrieben (Boel et al., *Lipids*, Bd. 23 (1988), S. 701-706; de Caro et al., *Biochim. Biophys. Acta*, Bd. 671 (1981), S. 129-138; Winkler et al., *Nature*, Bd. 343 (1990), S. 771-774). Ferner wurde auch die Tertiärstruktur einer stärker beschränkten Anzahl von Lipasen aufgeklärt (Winkler et al., *Nature*, Bd. 343 (1990), S. 771-774; Brady et al., *Nature*, Bd. 343 (1990), S. 767-770; J. D. Schrag et al., *Nature*, Bd. 351 (1991), S. 761-764). Aus diesen Untersuchungen geht hervor, daß Lipasen offensichtlich bestimmte gemeinsame Strukturmerkmale aufweisen, daß aber andererseits auch unter den Lipasen erhebliche strukturelle Variationen bestehen.

**Zusammenfassende Darstellung der Erfindung**

Weitere Untersuchungen haben nunmehr ergeben, daß sich verbesserte Eigenschaften von Lipasen durch eine oder mehrere spezifische Mutationen in der DNA-Sequenz, die eine spezielle Lipase exprimiert, erzielen lassen, wodurch man Lipase-Varianten mit derartigen verbesserten Eigenschaften erhält.

Infolgedessen betrifft die vorliegende Erfindung gemäß einem Aspekt eine Lipase-Variante einer parentalen Lipase, die eine trypsinartige ka-

talytische Triade umfaßt, die ein aktives Serin, das sich in einer vorwiegend hydrophoben, länglichen Bindungstasche des Lipase-Moleküls befindet, einschließt, wobei die elektrostatische Ladung und/oder die hydrophobe Beschaffenheit der Lipid-Kontaktzone der parentalen Lipase durch Deletion oder Substitution einer oder mehrerer negativ geladener Aminosäurerreste durch neutrale oder positiv geladene Aminosäurerreste und/oder durch Substitution einer oder mehrerer neutraler Aminosäurerreste durch positiv geladene Aminosäurerreste und/oder durch Deletion oder Substitution einer oder mehrerer hydrophiler Aminosäurerreste durch hydrophobe Aminosäurerreste verändert ist. Einfachheitshalber wird diese Lipase-Variante nachstehend als Lipase-Variante I bezeichnet.

Im gegebenen Zusammenhang bezeichnet der Ausdruck "trypsinartig" den Sachverhalt, daß die parentale Lipase eine katalytische Triade an der aktiven Stelle umfaßt, die der Triade von Trypsin entspricht, d. h. die Aminosäuren Ser, His und einen der Reste Asp, Glu, Asn oder Gln. Einige Lipasen können eine Oberflächen-Schleifenstruktur umfassen, die das aktive Serin bedeckt, wenn die Lipase in ihrer inaktiven Form vorliegt (ein Beispiel für eine derartige Lipase wird von Brady et al. beschrieben; Nature, Bd. 343 (1990), S. 767-770). Wird die Lipase aktiviert, so wird die Schleifenstruktur unter Freilegen der Reste des aktiven Zentrums verschoben, was eine Oberfläche mit erhöhter Oberflächenhydrophobizität schafft, die bei oder während der Hydrolyse in Wechselwirkung mit dem Lipidsubstrat tritt. Im vorliegenden Fall wird diese Oberfläche als die "Lipidkontaktezone" bezeichnet, was Aminosäurereste umfassen soll, die sich innerhalb dieser Oberfläche befinden oder einen Teil davon bilden. Diese Reste können an der Lipase-Wechselwirkung mit dem Substrat bei oder während der Hydrolyse teilnehmen, wenn die Lipase die Hydrolyse von Triglyceriden aus der Lipidphase bei Aktivierung durch Kontakt mit der Lipidoberfläche bewirkt. Während der Hydrolyse von Triglyceriden werden Fettsäuren und Mono- und Diglyceride in unterschiedlichen Mengen gebildet. Ein Grund für die Veränderung der elektrostatischen Ladung und/oder der hydrophoben Beschaffenheit der Lipidkontaktezone durch Veränderung der Lipase in dieser Zone besteht darin, daß die während der Hydrolyse gebildeten Fettsäuren in der Lipidphase verbleiben können, wodurch eine negativ geladene Oberfläche entsteht. Wenn die Lipase für Waschzwecke verwendet wird, können negativ geladene Wasch- und Reinigungsmittel (nachstehend kurz Waschmittel) negative Ladungen an der Lipidoberfläche bilden. Somit kann es durch Herstellung von Lipase-Varianten, die weniger

stark negativ geladen sind und/oder stärker hydrophob sind, ermöglicht werden, Lipasen mit unterschiedlichen Spezifitäten und/oder verbesserten, Eigenschaften zu erhalten.

Die vorliegende Erfindung betrifft auch ein DNA-Konstrukt, das eine DNA-Sequenz, die für eine Lipase-Variante gemäß den vorstehenden Angaben kodiert, umfaßt, einen rekombinanten Expressionsvektor, der dieses DNA-Konstrukt trägt, eine mit dem DNA-Konstrukt oder dem Expressionsvektor transformierte Zelle sowie ein Verfahren zur Herstellung einer erfundungsgemäßen Lipase-Variante durch Züchten und Wachsenlassen der Zelle unter Bedingungen, die zur Bildung der Lipase-Variante führen, wonach die Lipase-Variante aus der Kultur gewonnen wird.

Ferner betrifft die Erfindung ein Waschmitteladditiv, das eine erfundungsgemäße Lipase-Variante umfaßt, gegebenenfalls in Form eines staubfreien Granulats, einer stabilisierten Flüssigkeit oder eines geschützten Enzyms, sowie eine Waschmittelzusammensetzung, die die erfundungsgemäße Lipase-Variante enthält.

#### Ausführliche Beschreibung der Erfindung

In der vorliegenden Beschreibung und in den Ansprüchen werden die folgenden Abkürzungen verwendet:

##### Aminosäuren:

A	=	Ala	=	Alanin
V	=	Val	=	Valin
L	=	Leu	=	Leucin
I	=	Ile	=	Isoleucin
P	=	Pro	=	Prolin
F	=	Phe	=	Phenylalanin
W	=	Trp	=	Tryptophan
M	=	Met	=	Methionin
G	=	Gly	=	Glycin
S	=	Ser	=	Serin
T	=	Thr	=	Threonin
C	=	Cys	=	Cystein
Y	=	Tyr	=	Tyrosin
N	=	Asn	=	Asparagin
Q	=	Gln	=	Glutamin
D	=	Asp	=	Asparaginsäure
E	=	Glu	=	Glutaminsäure
K	=	Lys	=	Lysin

R = Arg = Arginin  
 H = His = Histidin

Bei der Beschreibung der erfindungsgemäßen Lipase-Varianten wird einfacheitshalber die folgende Nomenklatur verwendet: ursprüngliche Aminosäure(n): Position(en): substituierte Aminosäure(n)

Gemäß dieser Nomenklatur wird beispielsweise die Substitution von Glycin durch Glutaminsäure in Position 195 folgendermaßen wiedergegeben:

Gly 195 Glu oder G195E.

Eine Deletion von Glycin in der gleichen Position wird folgendermaßen wiedergegeben:

Gly 195\* oder G195\*.

Eine Insertion eines zusätzlichen Aminosäurerestes, wie Lysin, wird folgendermaßen wiedergegeben:

Gly 195 GlyLys oder G195GK.

Wenn eine spezielle Lipase eine "Deletion" im Vergleich zu anderen Lipasen aufweist und eine Insertion in einer derartigen Position vorgenommen wird, wird dies wiedergegeben als:

\* 36 Asp oder \*36D

für eine Insertion einer Asparaginsäure in Position 36.

Mehrfachmutationen werden durch Plus-Zeichen voneinander getrennt, d. h. der Ausdruck

Arg 170 Tyr + Gly 195 Glu oder R170Y+G195E

gibt Mutationen in den Positionen 170 und 195 wieder, wobei Arginin und Glycin durch Tyrosin bzw. Glutaminsäure ersetzt sind.

Erfindungsgemäß handelt es sich bei der Lipase-Variante I vorzugsweise um ein Enzym, bei der ein oder mehr Glutaminsäure- oder Asparaginsäurereste der Lipid-Kontaktzone der Lipase durch Glutamin, Asparagin, Alanin, Leucin, Valin, Serin, Threonin, Lysin oder Arginin ersetzt sind.

Obgleich die parentale Lipase aus verschiedenen Quellen abgeleitet sein kann, z. B. Säugetier-Lipasen, wie pankreatische, gastrische, hepatische oder Lipoprotein-Lipasen, wird im allgemeinen eine mikrobielle Lipase bevorzugt. Als solche kann die parentale Lipase unter Hefe-Lipasen, z. B. Candida-Lipasen, bakteriellen Lipasen, z. B. Pseudomonas-Lipasen, oder mykotischen Lipasen, z. B. Humicola oder Rhizomucor-Lipasen, abgeleitet sein. Es ist besonders bevorzugt, die parentale Lipase aus einer Gruppe von strukturell homologen Lipasen auszuwählen.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der erfindungsgemäßen Lipase-Variante I handelt es sich bei der parentalen Lipase um eine

Rhizomucor miehei-Lipase, insbesondere um die in EP-305 216 beschriebene Lipase. In dieser Ausführungsform können ein oder mehr negativ geladene Aminosäurereste durch einen oder mehr positiv geladene oder neutrale Aminosäurereste gemäß folgenden Angaben substituiert sein:

D91N, K, R, A, V, L, S, T;  
 D256N, K, R, A, V, L, S, T;  
 D226N, K, R, A, V, L, S, T;  
 D61N, K, R, A, V, L, S, T;  
 D113N, K, R, A, V, L, S, T;  
 E201Q, K, R, A, V, L, S, T;  
 D243N, K, R, A, V, L, S, T.

Gemäß einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Lipase-Variante I der Erfindung handelt es sich bei der parentalen Lipase um eine Humicola lanuginosa-Lipase, insbesondere um die durch den Stamm H. lanuginosa DSM 4106 gebildete Lipase (vgl. EP-258 068). In dieser Ausführungsform können ein oder mehr negativ geladene Aminosäurereste durch einen oder mehr neutrale oder positiv geladene Aminosäurereste gemäß folgenden Angaben ersetzt sein:

E87Q, K, R, A, N, T, S, L, V;  
 D254N, K, R, A, Q, T, S, L, V;  
 D242N, K, R, A, Q, T, S, L, V;  
 E210Q, K, R, A, N, T, S, L, V;  
 E56Q, K, R, A, N, T, S, L, V;  
 D96N, K, R, A, Q, T, S, L, V;  
 D111N, K, R, A, Q, T, S, L, V;  
 D62A, Q, N, T, S, K, R, L, V;  
 E219A, Q, N, T, S, K, R, L, V;  
 E234A, Q, N, T, S, K, R, L, V;  
 E57A, Q, N, T, S, K, R, L, V;  
 E99A, Q, N, T, S, K, R, L, V;  
 D27A, Q, N, T, S, K, R, L, V; oder  
 E239A, Q, N, T, S, K, R, L, V.

Besonders bevorzugt werden erfindungsgemäß folgende Substitutionen:

E87Q + D254N + D242N + E210Q;  
 E87Q + D254N + E210Q;  
 D96N + E87Q + D254N;  
 R209A + E210A.

Alternativ können ein oder mehr neutrale Aminosäurereste durch einen oder mehr positiv geladene Aminosäurereste gemäß folgenden Angaben ersetzt sein:

T267K,R;  
 S85K,R;  
 T226K,R;  
 N88K,R;  
 N92K,R;  
 I255K,R;  
 I202K,R;  
 L206K,R;  
 L259K,R;  
 V203K,R; oder  
 L227K,R

Es ist darauf hinzuweisen, daß die *Humicola lanuginosa*-Lipase und die *Rhizomucor miehei*-Lipase zur gleichen Gruppe von Lipasen gehören. Dies bedeutet, daß die gesamte dreidimensionale Struktur der beiden Lipasen sehr ähnlich ist, wobei durch Röntgenkristallographie ein hoher Homologiegrad gezeigt wurde (ein Computermodell der *H. lanuginosa*- und der *Rh. miehei*-Lipase ist in den Figg. 1A und B bzw. 2A und B dargestellt, woraus die Ähnlichkeiten zwischen den Lipid-Kontaktzonen der beiden Lipasen klar ersichtlich sind). Es ist daher wahrscheinlich, daß Modifikationen des für die eine Lipase angegebenen Typs sich auch bei der anderen Lipase als funktionsfähig erweisen.

Es ist darauf hinzuweisen, daß erfindungsgemäß beliebige Modifikationen der Aminosäuresequenz gemäß den vorstehenden Angaben für die Lipase-Variante I mit einer beliebigen der übrigen vorerwähnten Modifikationen oder einer beliebigen der Modifikationen für die Varianten II und III gemäß den Angaben in WO-92/05249 kombiniert werden können.

#### Verfahren zur Herstellung der erfindungsgemäßen Lipase-Varianten

Aus dem Stand der Technik sind verschiedene Verfahren zur Einführung von Mutationen in Gene bekannt. Nach einer kurzen Erörterung der Klonierung von für Lipase kodierenden DNA-Sequenzen werden Verfahren zur Erzeugung von Mutationen an bestimmten Stellen innerhalb der für Lipase kodierenden Sequenzen erörtert.

#### Klonierung einer für eine Lipase kodierenden DNA-Sequenz

Eine für eine parentale Lipase kodierende DNA-Sequenz kann aus beliebigen Zellen oder Mikroorganismen, die die in Frage stehende Lipase

erzeugen, nach verschiedenen, aus dem Stand der Technik bekannten Verfahren isoliert werden. Zunächst sollte eine genomische DNA- und/oder cDNA-Bank unter Verwendung von chromosomaler DNA oder Messenger-RNA aus dem Organismus, der die zu untersuchende Lipase bildet, aufgebaut werden. Wenn sodann die Aminosäuresequenz der Lipase bekannt ist, können homologe, markierte Oligonucleotidsonden synthetisiert und zur Identifizierung von für Lipase kodierenden Klonen aus einer Genombank von bakterieller DNA oder aus einer mykotischen cDNA-Bank verwendet werden. Alternativ kann eine markierte Oligonucleotidsonde, die zu Lipase homologe Sequenzen enthält, aus einem anderen Stamm von Bakterien oder Pilzen als eine Sonde zur Identifizierung der für Lipase kodierenden Klonen verwendet werden, wobei Hybridisierungs- und Waschbedingungen von geringerer Stringenz angewandt werden.

Ein weiteres Verfahren zum Identifizieren von Lipase bildenden Klonen beinhaltet die Insertion von Fragmenten einer genomischen DNA in einen Expressionsvektor, z. B. ein Plasmid, die Transformation von Lipase-negativen Bakterien mit der erhaltenen genomischen DNA-Bank und anschließend das Ausstreichen der transformierten Bakterien auf Agar, das ein Substrat für Lipase enthält. Bakterien, die das die Lipase aufweisende Plasmid enthalten, bilden dann Kolonien, die von einem Hof aus klarem Agar umgeben sind, was auf die Verdauung des Substrats durch sezernierte Lipase zurückzuführen ist.

Alternativ kann die für das Enzym kodierende DNA-Sequenz synthetisch durch eingeführte Standardverfahren hergestellt werden, beispielsweise durch das von S. L. Beaucage und M. H. Caruthers, Tetrahedron Letters, Bd. 22 (1981), S. 1859-1869, beschriebene Phosphoamidit-Verfahren oder durch das von Matthes et al., The EMBO J., Bd. 3 (1984), S. 801-805, beschriebene Verfahren. Gemäß dem Phosphoamidit-Verfahren werden Oligonucleotide synthetisiert, beispielsweise in einem automatischen DNA-Synthesegerät, gereinigt, anellierte, ligiert und in geeignete Vektoren geklont.

Schließlich kann die DNA-Sequenz gemischten genomischen und synthetischen Ursprungs, gemischten synthetischen und cDNA-Ursprungs oder gemischten genomischen und cDNA-Ursprungs sein, die (dementsprechend) durch Ligation von Fragmenten synthetischen, genomischen oder cDNA-Ursprungs hergestellt worden ist, wobei die Fragmente den verschiedenen Teilen der gesamten DNA-Sequenz entsprechen und wobei die Herstellung gemäß standardmäßigen Techniken erfolgt. Die DNA-Sequenz kann auch durch die Poly-

merase-Kettenreaktion (PCR) unter Verwendung von speziellen Primern hergestellt werden, beispielsweise gemäß dem in US-4 683 202 oder gemäß dem von R. K. Saiki et al., *Science*, Bd. 239 (1988), S. 487-491 beschriebenen Verfahren.

**Positionsgerichtete Mutagenese der für Lipase kodierenden Sequenz**

Nachdem eine für Lipase kodierende DNA-Sequenz isoliert worden ist und die gewünschten Mutationspositionen identifiziert worden sind, können Mutationen unter Verwendung synthetischer Oligonucleotide eingeführt werden. Diese Oligonucleotide enthalten Nucleotidsequenzen, die die gewünschten Mutationspositionen flankieren. Mutante Nucleotide werden während der Oligonucleotid-Synthese inseriert. In einem speziellen Verfahren wird eine einzelsträngige DNA-Lücke, die die für die Lipase kodierende Sequenz überbrückt, in einem Vektor, der das Lipase-Gen trägt, geschaffen. Anschließend wird das synthetische Nucleotid, das die gewünschte Mutation trägt, an einen homologen Bereich der einzelsträngigen DNA anelisiert. Die verbleibende Lücke wird dann mit DNA-Polymerase I (Klenow-Fragment) aufgefüllt, und das Konstrukt wird unter Verwendung von T4-Ligase verknüpft. Ein spezielles Beispiel für dieses Verfahren wird von Morinaga et al. (*Biotechnology*, Bd. 2 (1984), S. 646-639) beschrieben. Das US-Patent 4 760 025 (Estell et al., Ausgabetag 26. Juli 1988) beschreibt die Einführung von Oligonucleotiden die für Mehrfachmutationen kodieren, unter Durchführung von geringen Veränderungen der Kassette, wobei jedoch durch das Morinaga-Verfahren eine noch größere Vielzahl von Mutationen zu jedem Zeitpunkt eingeführt werden kann, da eine Vielzahl von Oligonucleotiden mit unterschiedlichen Längen eingeführt werden kann.

Ein weiteres Verfahren zur Einführung von Mutationen in für Lipase kodierende Sequenzen wird von Nelson und Long, *Analytical Biochemistry*, Bd. 180 (1989), S. 147-151, beschrieben. Dieses Verfahren beinhaltet die dreistufige Erzeugung eines PCR-Fragments, das die gewünschte Mutation enthält und unter Verwendung eines chemisch synthetisierten DNA-Strangs als einer der Primer bei den PCR-Reaktionen eingeführt wird. Aus dem durch PCR erzeugten Fragment lässt sich ein DNA-Fragment, das die Mutation trägt, durch Spaltung mit Restriktionsendonukleasen isolieren und wieder in ein Expressionsplasmid einbauen (vgl. auch die Figg. 3 und 4, wo dieses Verfahren näher dargestellt wird).

**Expression von Lipase-Varianten**

Erfindungsgemäß lässt sich eine für eine mutierte Lipase kodierende Sequenz, die nach den vorstehend beschriebenen Verfahren oder durch be-

liebige, aus dem Stand der Technik bekannte, alternative Verfahren hergestellt worden ist, in Enzymform exprimieren, wobei man einen Expressionsvektor verwendet, der typischerweise Kontrollsequenzen umfaßt, die für einen Promotor, einen Operator, eine Ribosomenbindungsstelle, ein Translationsinitiationssignal und gegebenenfalls für ein Repressorgen oder verschiedene Aktivatorgene kodieren. Um die Sekretion des exprimierten Proteins zu ermöglichen, können Nucleotide, die für eine "Signalsequenz" kodieren, vor der für die Lipase kodierenden Sequenz eingebaut werden. Zur Expression unter der Steuerung von Kontrollsequenzen wird ein erfundungsgemäß zu behandelndes Zielgen funktionell mit den Kontrollsequenzen im richtigen Leseraster verknüpft. Zu Promotorsequenzen, die in Plasmidvektoren eingebaut werden können, und die die Transkription des mutanten Lipase-Gens unterstützen, gehören (ohne Beschränkung hierauf) der prokaryontische  $\beta$ -Lactamase-Promotor (Villa-Kamaroff et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Bd. 75 (1978), S. 3727-3731) und der tac-Promotor (DeBoer et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Bd. 80 (1983), S. 21-25). Weitere Literaturstellen finden sich in "Useful proteins from recombinant bacteria", Scientific American, Bd. 242 (1980), S. 74-94.

Gemäß einer Ausführungsform wird *B. subtilis* durch einen Expressionsvektor, der die mutierte DNA trägt, transformiert. Soll die Expression in einem sezernierenden Mikroorganismus, wie *B. subtilis*, stattfinden, so kann sich eine Signalsequenz dem Translationsinitiationssignal anschließen und der in Frage stehenden DNA-Sequenz vorhergehen. Die Signalsequenz bewirkt einen Transport des Expressionsprodukts zur Zellwand, wo es bei der Sekretion vom Produkt gespalten wird. Der vorstehend definierte Ausdruck "Kontrollsequenzen" soll eine Signalsequenz umfassen, falls diese vorhanden ist.

In einem derzeit bevorzugten Verfahren zur Herstellung der erfundungsgemäßen Lipase-Varianten wird ein filamentöser Pilz als Wirtsorganismus verwendet. Beim Wirtsorganismus in Form des filamentösen Pilzes kann es sich zweckmäßigerweise um einen Pilz handeln, der bisher als Wirt zur Herstellung von rekombinanten Proteinen verwendet worden ist, z. B. ein Stamm von *Aspergillus sp.*, wie *A. niger*, *A. nidulans* oder *A. oryzae*. Die Verwendung von *A. oryzae* bei der Herstellung von rekombinanten Proteinen wird ausführlich beispielsweise in EP-238 023 beschrieben.

Zur Expression von Lipase-Varianten in *Aspergillus*, geht der für die Lipase-Variante kodierenden DNA-Sequenz ein Promotor voraus. Beim Promotor kann es sich um eine beliebige DNA-Sequenz handeln, die eine starke

transkriptionale Aktivität in *Aspergillus* aufweist. Er kann von einem Gen abgeleitet sein, das für ein extrazelluläres oder intrazelluläres Protein kodiert, z. B. für eine Amylase, eine Glucoamylase, eine Protease, eine Lipase, eine Cellulase oder ein glykolytisches Enzym.

Beispiele für geeignete Promotoren sind solche, die sich von den Genen ableiten, die kodieren für *A. oryzae*-TAKA-Amylase, *Rhizomucor miehei*-Aspartat-proteinase, *A. niger*-neutrale  $\alpha$ -Amylase, *A. niger*-säurestabile  $\alpha$ -Amylase, *A. niger*-Glucoamylase, *Rhizomucor miehei*-Lipase, *A. oryzae*-alkalische Protease oder *A. oryzae*-Triosephosphat-isomerase.

Wenn der Wirtsorganismus *A. oryzae* ist, stellt der *A. oryzae*-TAKA-Amylase-Promotor einen bevorzugten Promotor für die Verwendung im erfundungsgemäßen Verfahren dar, da er in *A. oryzae* eine starke transkriptionale Aktivität aufweist. Die Sequenz für den TAKA-Amylase-Promotor ergibt sich aus EP-238 023.

Terminations- und Polyadenylierungssequenzen können in geeigneter Weise von den gleichen Quellen wie der Promotor abgeleitet sein.

Geeigneterweise handelt es sich bei den Techniken für die Transformation einer Pilzwirtszelle um die in EP-238 023 beschriebenen Techniken.

Um die Sekretion der Lipase-Variante aus der Wirtszelle zu gewährleisten, kann der für die Lipase-Variante kodierenden DNA-Sequenz eine Signalsequenz vorausgehen, bei der es sich um eine natürlich vorkommende Signalsequenz, um einen funktionellen Teil davon oder um eine synthetische Sequenz handelt, die die Sekretion des Proteins aus der Zelle gewährleistet. Insbesondere kann sich die Signalsequenz von einem der folgenden Gene ableiten: ein Gen, das für eine *Aspergillus* sp.-Amylase oder -Glucoamylase kodiert, ein Gen, das für eine *Rhizomucor miehei*-Lipase oder -Protease kodiert, oder ein Gen, das für eine *Humicola*-Cellulase-Xylanase oder -Lipase kodiert. Die Signalsequenz leitet sich vorzugsweise von dem Gen ab, das für *A. oryzae*-TAKA-Amylase, *A. niger*-neutrale  $\alpha$ -Amylase, *A. niger*-säurestabile  $\alpha$ -Amylase oder *A. niger*-Glucoamylase kodiert.

Bei dem Medium, das zur Züchtung der transformierten Wirtszellen verwendet wird, kann es sich um beliebige herkömmliche Medien handeln, die zur Züchtung von *Aspergillus*-Zellen geeignet sind. Die Transformanten sind üblicherweise stabil und können in Abwesenheit eines Selektionsdrucks gezüchtet werden. Erweisen sich die Transformanten jedoch als instabil, so kann für die Selektion ein in die Zellen eingeführter Selektionsmarker verwendet werden.

Das aus den Wirtszellen sezernierte, reife Lipase-Protein kann zweckmäßigerweise nach bekannten Verfahren aus dem Kulturmedium gewonnen werden, wozu die Trennung der Zellen aus dem Medium durch Zentrifugation oder Filtration und die Fällung von proteinhaltigen Komponenten des Mediums mit einem Salz, wie Ammoniumsulfat, und anschließende chromatographische Verfahren, wie Ionenaustauschchromatographie, Affinitätschromatographie oder dergl., gehören.

Die vorliegende Erfindung betrifft auch ein Waschmitteladditiv, das eine erfindungsgemäße Lipase-Variante enthält, vorzugsweise in Form eines staubfreien Granulats, einer stabilisierten Flüssigkeit oder eines geschützten Enzyms. Staubfreie Granulat lassen sich beispielsweise gemäß US-4 106 991 und 4 661 452 (beide Novo Industri A/S) herstellen und können gegebenenfalls nach bekannten Verfahren mit einem Überzug versehen werden. Flüssige Enzympräparate können beispielsweise gemäß bekannten Verfahren stabilisiert werden, indem man ein Polyol, wie Propylenglykol, einen Zucker oder Zuckerkalkohol, Milchsäure oder Borsäure zusetzt. Weitere Enzymstabilisatoren sind aus dem Stand der Technik bekannt. Geschützte Enzyme können gemäß dem in EP-238 216 beschriebenen Verfahren hergestellt werden.

Das Waschmitteladditiv kann geeigneterweise 0,02-200 mg Enzymprotein pro Gramm des Additivs enthalten. Es ist darauf hinzuweisen, daß das Waschmitteladditiv ferner ein oder mehr weitere Enzyme, z. B. eine Protease, Cellulase, Peroxidase oder Amylase, die herkömmlicherweise in Waschmitteladditiven enthalten sind, umfassen kann.

Gemäß einem weiteren Aspekt betrifft die Erfindung eine Waschmittelzusammensetzung, die eine erfindungsgemäße Lipase-Variante umfaßt. Erfindungsgemäße Waschmittelzusammensetzungen umfassen zusätzlich oberflächenaktive Mittel, bei denen es sich um oberflächenaktive Mittel vom anionischen, nicht-ionogenen, kationischen, amphoteren oder zwitterionischen Typ sowie um Gemische dieser Klassen von oberflächenaktiven Mitteln handeln kann. Typische Beispiele für geeignete oberflächenaktive Mittel sind lineare Alkylbenzolsulfonate (LAS),  $\alpha$ -Olefinsulfonate (AOS), Alkoholethoxysulfate (AEOS), Alkoholethoxylate (AEO), Alkylsulfate (AS), Alkylpolyglycoside (APG) und Alkalimetallsalze von natürlichen Fettsäuren.

Erfindungsgemäße Waschmittelzusammensetzungen können weitere, aus dem Stand der Technik bekannte Waschmittelbestandteile enthalten, z. B. Builder, Bleichmittel, Bleichaktivatoren, Antikorrosionsmittel, Maskie-

rungsmittel, Mittel gegen Rückverschmutzung, Parfums, Enzymstabilisatoren und dergl.

Die erfindungsgemäße Waschmittelzusammensetzung kann in beliebiger zweckmäßiger Form, z. B. als Pulver oder Flüssigkeit, zubereitet werden. Das Enzym kann in einem flüssigen Waschmittel stabilisiert werden, indem man Enzymstabilisatoren gemäß den vorstehenden Angaben zusetzt. Üblicherweise beträgt der pH-Bereich einer Lösung der erfindungsgemäßen Waschmittelzusammensetzung 7-12 und in einigen Fällen 7,0-10,5. Weitere Waschmittelenzyme, wie Proteasen, Cellulasen, Peroxidasen oder Amylasen, können den erfindungsgemäßen Waschmittelzusammensetzungen zugesetzt werden, entweder getrennt oder in einem Kombinationsadditiv gemäß den vorstehenden Angaben.

#### Kurze Beschreibung der Zeichnung

Die vorliegende Erfindung wird nachstehend unter Bezugnahme auf die beigefügte Zeichnung beschrieben.

Figg. 1A und B sind Computermodelle, die die dreidimensionale Struktur der Lipidkontaktezone der *H. lanuginosa*-Lipase zeigen, wobei sich die Lipase in ihrer inaktiven (A) bzw. aktiven (B) Form befindet. "Weiße" Reste stellen hydrophobe Aminosäuren dar (Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Trp, Gly und Meth), "gelbe" Reste stellen hydrophile Aminosäuren dar (Thr, Ser, Gln, Asn, Tyr und Cys), "blaue" Reste stellen positiv geladene Aminosäuren dar (Lys, Arg und His) und "rote" Reste stellen negativ geladene Aminosäuren dar (Glu und Asp).

Figg. 2A und 2B sind Computermodelle zur Darstellung der dreidimensionalen Struktur der Lipidkontaktezone der *Rh. miehei*-Lipase, wobei die Lipase in ihrer inaktiven (A) bzw. aktiven (B) Form vorliegt. "Weiße" Reste stellen hydrophobe Aminosäuren dar (Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Trp, Gly und Meth), "gelbe" Reste stellen hydrophile Aminosäuren dar (Thr, Ser, Gln, Asn, Tyr und Cys), "blaue" Reste stellen positiv geladene Aminosäuren dar (Lys, Arg und His) und "rote" Reste stellen negativ geladene Aminosäuren dar (Glu und Asp).

Fig. 3 ist eine schematische Darstellung für die Herstellung von Plasmiden, die für Lipase-Varianten kodieren, durch die Polymerase-Kettenreaktion (PCR).

Fig. 4 ist eine schematische Darstellung der dreistufigen Mutagenese durch PCR.

Fig. 5 zeigt eine Restriktionskarte des Plasmids pAO1.

Fig. 6 zeigt eine Restriktionskarte des Plasmids pAHL.

Fig. 7 zeigt eine Restriktionskarte des Plasmids pARML.

Nachstehend wird die vorliegende Erfindung in den folgenden Beispielen näher erläutert. Diese Beispiele sollen in keiner Weise den Schutzzumfang der beanspruchten Erfindung beschränken.

**Allgemeine Verfahren**

**Expression von *Humicola lanuginosa*-Lipase und *Rhizomucor miehei*-Lipase in *Aspergillus oryzae***

Die Klonierung von *Humicola lanuginosa*-Lipase und *Rhizomucor miehei*-Lipase wird in EP-305 216 bzw. EP-238 023 beschrieben. Diese Patentanmeldungen beschreiben auch die Expression und Charakterisierung der beiden Lipasen in *Aspergillus oryzae*. Die beiden verwendeten Expressionsplasmide werden als p960 (mit dem *H. lanuginosa*-Lipase-Gen) und p787 (mit dem *R. miehei*-Lipase-Gen) bezeichnet.

Die in der vorliegenden Anmeldung verwendeten Expressionsplasmide sind identisch mit p787 und p960, ausgenommen kleinere Modifikationen unmittelbar in 3'-Stellung zu den für die Lipase kodierenden Regionen. Diese Modifikationen wurden auf folgende Weise vorgenommen: p960 wurde mit NruI- und BamHI-Restriktionsenzymen verdaut. Zwischen diesen beiden Positionen wurde das BamHI/NheI-Fragment des Plasmids pBR322, in dem das NheI-Fragment mit Klenow-Polymerase gefüllt war, kloniert, wodurch das Plasmid pAO1 entstand (Fig. 5), das jeweils eine einzige BamHI- und NheI-Stelle enthält. Zwischen diesen beiden einzigen Stellen wurden die BamHI/XbaI-Fragmente von p960 und p787 kloniert, wodurch man pAHL (Fig. 6) bzw. pARML (Fig. 7) erhielt.

**Positionsgerichtete *in vitro*-Mutagenese von Lipase-Genen**

Drei verschiedene Wege wurden zur Einführung von Mutationen in die Lipase-Gene herangezogen.

Ein Verfahren bediente sich der positionsgerichteten Oligonucleotid-Mutagenese, die von Zoller & Smith, DNA, Bd. 3, Nr. 6 (1984), S. 479-488 beschrieben wurde. Dieses Verfahren wird nachstehend kurz erläutert und ist in Beispiel 1 ausführlich beschrieben.

Isoliert vom Expressionsplasmid wird das in Frage stehende Lipase-Gen in einen kreisförmigen M13-Bakteriophagenvektor inseriert. An das einzelsträngige Genom wird ein chemisch synthetisierter, komplementärer DNA-Strang anelliert. Dieser DNA-Strang enthält die einzuführende Mutation, flankiert von Sequenzen, die komplementär zu den Lipase-Sequenzen der kreisförmigen DNA sind. In vitro wird der Primer dann in der gesamten Länge des kreisförmigen Genoms auf biochemischem Wege unter Verwendung

von Klenow-Polymerase erweitert. Bei Transformation in *E. coli* ergibt das Heteroduplex eine doppelsträngige DNA mit der gewünschten Sequenz, aus der ein Fragment isoliert und in das Expressionsplasmid reinsertert werden kann.

Ein weiteres angewandtes Verfahren wird von Nelson & Long, *Analytical Biochemistry*, Bd. 180 (1989), S. 147-151 beschrieben. Es beinhaltet die dreistufige Erzeugung eines PCR-Fragments (PCR = Polymerase-Kettenreaktion) mit der gewünschten Mutation, die unter Verwendung eines chemisch synthetisierten DNA-Strangs als einer der Primer bei den PCR-Reaktionen eingeführt worden ist. Aus dem durch PCR erzeugten Fragment lässt sich ein DNA-Fragment, das die Mutation trägt, durch Spaltung mit Restriktionsenzymen isolieren und in das Expressionsplasmid reinsertern. Dieses Verfahren wird ausführlich in Beispiel 3 beschrieben. Ferner wird dieses Verfahren in den Figg. 3 und 4 näher skizziert.

In einem weiteren Verfahren, das üblicherweise als "Kassetten-Mutagenese" bezeichnet wird, wird ein Segment zwischen zwei Restriktionsstellen der für Lipase kodierenden Region durch ein synthetisches DNA-Fragment, das die gewünschte Mutation trägt, ersetzt.

**Beispiel 1: Konstruktion eines Plasmids, das die D96L-Variante von *Humicola lanuginosa*-Lipase exprimiert**

#### Isolierung des Lipase-Gens

Das Expressionsplasmid p960 enthält die Kodierungsregion für *Humicola lanuginosa*-Lipase an einem BamHI-XbaI-Restriktionsfragment (die DNA- und Aminosäuresequenzen der Lipase sind in der beigefügten Sequenzliste als ID NR: 1 dargestellt). Das BamHI-XbaI-Fragment wurde auf folgende Weise isoliert: Das Expressionsplasmid wurde mit den Restriktionsendonukleasen BamHI und XbaI unter folgenden Bedingungen inkubiert: 5 µg Plasmid, 10 Einheiten BamHI, 10 Einheiten XbaI, 100 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH-Wert 7,5, 10 mM MgCl<sub>2</sub> und 1 mM DTT in einem Volumen von 50 µl. Die Temperatur betrug 37°C und die Reaktionszeit 2 Stunden. Die beiden Fragmente wurden an einem 1% Agarosegel getrennt. Das gewünschte Fragment wurde aus dem Gel isoliert.

#### Ligation an den Vektor M13mp18

Der Bakteriophagenvektor M13mp18 wurde in seiner doppelsträngigen, replikativen Form mit BamHI und XbaI unter den nachstehend beschriebenen Bedingungen verdaut. Das isolierte Restriktionsfragment wurde an den verdaulten Bakteriophagenvektor im nachstehend angegebenen Reaktionsgemisch verknüpft: Fragment 0,2 µg, Vektor 0,02 µg, 50 mM Tris-HCl, pH-Wert

7,4, 10 mM MgCl<sub>2</sub> 10 mM DTT und 1 mM ATP in einem Volumen von 20 µl, 3 Stunden bei 16°C. 5 µl dieses Gemisches wurden in *E. coli*-Stamm JM101 transformiert. Die Anwesenheit des Fragments im Vektor wurde durch Restriktionsenzym-Analyse der aus den Transformanten isolierten doppelsträngigen M13-DNA identifiziert.

**Isolierung von einzelsträngiger (ss) DNA (Matrize)**

Aus der vorstehend beschriebenen Transformante wurde ss-DNA gemäß dem Verfahren von Messing, Gene, Bd. 19 (1982), S. 269-276, isoliert.

**5'-Phosphorylierung des Mutagenisierungsprimers**

**Der Mutagenisierungsprimer mit der Sequenz**

5'-TTTCTTCAACAAGAAGTTAAGA-3' wurde am 5'-Ende in 30 µl Reaktionsgemisch mit einem Gehalt an 70 mM Tris-HCl, pH-Wert 7,0, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM DTT, 1 mM ATP, 100 pMol Oligonucleotid und 3,6 Einheiten T4-Polynukleotid-kinase phosphoryliert. Die Umsetzung wurde 30 Minuten bei 37°C durchgeführt. Anschließend wurde das Enzym durch 10-minütige Inkubation des Gemisches bei 65°C inaktiviert.

**Anellieren der Matrize und des phosphorylierten Mutagenisierungsprimers**

Die Anellierung der Matrize und des Primers wurde in einem Volumen von 10 µl mit einem Gehalt an 0,5 pMol Matrize, 5 pMol Primer, 20 mM Tris-HCl, pH-Wert 7,5, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM NaCl und 1 mM DTT durch 10-minütiges Erwärmen auf 65°C und anschließendes Abkühlen auf 0°C durchgeführt.

**Extensions/Ligations-Reaktion**

Das vorstehende Reaktionsgemisch wurde mit 10 µl des folgenden Gemisches versetzt: 0,3 mM dATP, 0,3 mM dCTP, 0,3 mM dGTP, 0,3 mM TTP, 1 mM ATP, 20 mM Tris-HCl, pH-Wert 7,5, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM DTT, 3 Einheiten T4-DNA-Ligase und 2,5 Einheiten Klenow-Polymerase. Anschließend wurde die Umsetzung 16 Stunden bei 16°C durchgeführt.

**Transformation von JM101**

Das vorstehende Reaktionsgemisch wurde unter Anwendung standardmäßiger Techniken in verschiedenen Verdünnungen in mit CaCl<sub>2</sub> behandelte *E. coli* JM101-Zellen transformiert und in 2 x YT-Deckagar auf 2 x YT-Agarplatten ausgestrichen (2 x YT = 16 g/Liter Trypton, 10 g/Liter Hefeextrakt, 5 g/Liter NaCl. 2 x YT-Deckagar = 2 x YT nach Zusatz von 0,4% Agarose und Autoklavierung. 2 x YT-Agarplatten = 2 x YT nach Zusatz von 2% Agar und Autoklavierung). Die Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert.

#### Identifizierung von positiven Klonen

Beim angewandten Verfahren handelte es sich um eine Plaques-Lift-Hybridisierung, die nachstehend beschrieben wird: Ein Nitrocellulosefilter wurde so auf eine Platte mit einer geeigneten Plaquedichte gelegt, daß der Filter benetzt wurde. Sodann wurde der Filter in folgende Lösungen getaucht: 1,5 M NaCl, 0,5 M NaOH für 30 sec, 1,5 M NaCl, 0,5 M Tris-HCl, pH-Wert 8,0 für 1 min und 2 x SSC (0,3 M NaCl, 0,03 M Natriumcitrat) bis zur späteren Verwendung. Der Filter wurde an 3MM Filterpapier getrocknet und 2 Stunden bei 80°C in einem Vakuumtrockenschrank getrocknet.

Der Mutagenisierungsprimer mit der Sequenz

5'-TTTCTTTCAACAAGAAGTTAAGA-3' wurde radioaktiv am 5'-Ende in einem Volumen von 30 µl mit einem Gehalt an 70 mM Tris-HCl, pH-Wert 7,5, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM DTT, 10 pMol Oligonucleotid, 20 pMol  $\gamma$ -32P-ATP und 3,5 Einheiten T4-Polynucleotid-kinase radioaktiv markiert. Das Gemisch wurde 30 min bei 37°C und sodann 5 min bei 100°C inkubiert.

Der getrocknete Filter wurde 2 Stunden bei 65°C in 6 x SSC, 0,2% Rinderserumalbumin, 0,2% Ficoll, 0,2% Polyvinylpyrrolidon, 0,2% Natriumdodecylsulfat (SDS) und 50 µg/ml ultraschallbehandelte Lachssperma-DNA vorhybridisiert. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch mit einem Gehalt an der markierten Sonde zu 15 ml eines frischen Vorhybridisierungsgemisches gegeben. Der Filter wurde über Nacht bei 27°C unter mäßigem Schütteln in dieses Gemisch getaucht. Nach Hybridisierung wurde der Filter 3 mal jeweils 15 min in 2 x SSC, 0,1% SDS gewaschen und der Autoradiographie unterworfen. Nach Waschen in der gleichen Lösung, aber nunmehr bei 50°C, und einer weiteren Autoradiographie wurden Plaques mit DNA-Sequenzen, die komplementär zum Mutagenisierungsprimer waren, identifiziert.

Da der identifizierte Klon das Ergebnis eines Heteroduplex ist, wurde die Plaque erneut ausgestrichen. Die Hybridisierungs- und Identifizierungsstufen wurden wiederholt.

#### Reinigung von doppelsträngiger M13-Phagen-DNA

Ein durch Rescreening erhaltener Klon wurde zur Infektion von *E. coli*-Stamm JM101 verwendet. Eine Kultur mit einem Gehalt an etwa 10<sup>8</sup> Phagen und 5 Kolonien von JM101 wurde 5 Stunden in 5 ml 2 x YT-Medium bei 37°C gezüchtet. Anschließend wurde doppelsträngige, kreisförmige DNA aus dem Pellet gemäß dem Verfahren von Birnboim & Doly, Nucleic Acids Res., Bd. 2 (1979), S. 1513 gereinigt.

**Isolierung eines für modifizierte Lipase kodierenden Restriktionsfragments**

Das vorstehend isolierte DNA-Präparat (etwa 5 µg) wurde mit jeweils etwa 10 Einheiten der Restriktionsendonukleasen BamHI und XbaI in 60 µl 100 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH-Wert 7,5, 10 mM MgCl<sub>2</sub> und 10 mM DTT 2 Stunden bei 37°C verdaut. Die DNA-Produkte wurden an einem Agarosegel getrennt. Das Fragment wurde aus dem Gel gereinigt.

**Ligation an den *Aspergillus*-Expressionsvektor pAO1 (Fig. 5)**

Das isolierte Restriktionsfragment wurde mit dem *Aspergillus*-Vektor pAO1, der mit den Restriktionsenzymen BamHI und NheI verdaut worden war, im nachstehend angegebenen Reaktionsgemisch verknüpft: 0,2 µg Fragment, 0,02 µg Vektor, 50 mM Tris-HCl, pH-Wert 7,4, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM DTT, 1 mM ATP in einem Gesamtvolumen von 20 µl. 5 µl dieses Reaktionsgemisches wurden zur Transformation von *E. coli*-Stamm MC1061 verwendet. In diesem Stamm wurde das modifizierte Expressionsplasmid identifiziert und vermehrt. Das Plasmid erhielt die Bezeichnung pAHLD96L und ist mit Ausnahme des modifizierten Codons mit pAHL identisch.

**Sequenzbestätigung von pAHLD96L**

Das mutagenisierte Plasmid wurde unter Anwendung des Didesoxy-Kettenterminationsverfahrens, das ursprünglich von Sanger beschrieben worden war, direkt am doppelsträngigen Plasmid sequenziert.

**Beispiel 2: Konstruktion von Plasmiden, die für andere Varianten von *Bumicola*-Lipase kodieren**

Weitere mutante Lipase-Gene wurden unter Anwendung des in Beispiel 1 beschriebenen Verfahrens konstruiert. Nachstehend sind die Plasmidbezeichnungen und die für die Modifikationen verwendeten Primer aufgelistet.

**Plasmidbezeichnung Primersequenz**

pAHLD96N	5' - TCTTTCAAGTTGAAGTTAAGA-3'
pAHLD111N	5' - GTGAAGCCGTTATGTCCCCCTG-3'
pAHLE87Q	5' - CGATCCAGTTTGATGGAACGA-3'
pAHLR209A/E210A	5' - GCTGTAACCGAAAGCAGCCGGGGAGTCT-3'
pAHLE87A	5' - CGATCCAGTTAGCTATGGAACG-3'
pAHLE56A	5' - CTCCAGAGTCAGCAAACGAGTA-3'
pAHLE56Q	5' - CCAGAGTCTTGAAACGAGTAG-3'
pAHLD111L	5' - AAGTGAAGCCCAAATGTCCCCCTG-3'
pAHLE210A	5' - TGTAACCGAAAGCGCGGGCGG-3'
pAHLE210Q	5' - TAACCGAATTGGCGCGGGCGGG-3'

pAHLR209A 5'-AACCGAATTCAAGCCGGCGGGAGT-3'

**Beispiel 3: Konstruktion eines Plasmids, das für die D254N-Variante von *Humicola lanuginosa*-Lipase kodiert**

**Linearisierung von Plasmid-pAHL**

Das kreisförmige Plasmid pAHL wurde mit dem Restriktionsenzym SphI in 50 µl des nachstehend angegebenen Reaktionsgemisches linearisiert: 50 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH-Wert 7,9, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM Dithiothreit, 1 µg Plasmid und 2 Einheiten SphI. Die Verdauung wurde 2 Stunden bei 37°C durchgeführt. Das Reaktionsgemisch wurde mit Phenol (äquilibriert mit Tris-HCl, pH-Wert 7,5) extrahiert und durch Zugabe von 2 Volumenteilen eiskaltem 96% Ethanol gefällt. Nach Zentrifugation und Trocknen des Pellets wurde die linearisierte DNA in 50 µl H<sub>2</sub>O gelöst. Die Konzentration wurde an einem Agarosegel bestimmt.

**Dreistufige PCR-Mutagenese**

Wie in Fig. 4 dargestellt, beinhaltet die dreistufige Mutagenisierung die Verwendung von 4 Primern:

Mutagenisierungsprimer (=A):

5'-GTGCGCAGGGATGTTCGGAATGTTAGG-3'

PCR-Helper 1 (=B):

5'-GGTCATCCAGTCACTGAGACCCTCTACCTATTAAATCGGC-3'

PCR-Helper 2 (=C): 5'-CCATGGCTTTCACGGTGTCT-3'

PCR-Handle (=D): 5'-GGTCATCCAGTCACTGAGAC-3'

Sämtliche drei Stufen wurden im nachstehend angegebenen Puffer durchgeführt: 10 mM Tris-HCl, pH-Wert 8,3, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,001% Gelatine, 0,2 mM dATP, 0,2 mM dCTP, 0,2 mM dGTP, 0,2 mM TTP, 2,5 Einheiten Taq-Polymerase.

In Stufe 1 wurden 100 pMol Primer A, 100 pMol Primer B und 1 fMol linearisiertes Plasmid zu insgesamt 100 µl Reaktionsgemisch gegeben. 15 Zyklen, bestehend aus 2 Minuten bei 95°C, 2 Minuten bei 37°C und 3 Minuten bei 72°C wurden durchgeführt.

Die Konzentration des PCR-Produkts wurde an einem Agarosegel bestimmt. Anschließend wurde die Stufe 2 durchgeführt. 0,6 pMol Produkt von Stufe 1 und 1 fMol linearisiertes Plasmid waren in insgesamt 100 µl des vorstehend angegebenen Puffers enthalten. 1 Zyklus von 5 Minuten bei 95°C, 2 Minuten bei 37°C und 10 Minuten bei 72°C wurde durchgeführt.

Das Reaktionsgemisch von Stufe 2 wurde mit 100 pMol Primer C und 100 pMol Primer D (jeweils 1 µl) versetzt. 20 Zyklen von 2 Minuten bei 95°C,

2 Minuten bei 37°C und 3 Minuten bei 72°C wurden durchgeführt. Dieser Vorgang stellte die Stufe 3 im Mutagenisierungsverfahren dar.

**Isolierung des mutierten Restriktionsfragments**

Das Produkt von Stufe 3 wurde aus einem Agarosegel isoliert und in 20 µl H<sub>2</sub>O in Lösung gebracht. Sodann wurde es mit dem Restriktionsenzym BspMII in einem Gesamtvolumen von 50 µl mit folgender Zusammensetzung verdaut: 100 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH-Wert 7,9, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT und 10 Einheiten BspMII. Die Inkubation wurde 2 Stunden bei 37°C durchgeführt. Das 264 bp-BspMIII-Fragment wurde aus einem Agarosegel isoliert.

**Ligation mit dem Expressionsvektor pAHL**

Das Expressionsplasmid pAHL wurde unter den vorstehend angegebenen Bedingungen mit BspMII gespalten. Das große Fragment wurde aus einem Agarosegel isoliert. Dieser Vektor wurde mit dem vorstehend isolierten mutierten Fragment verknüpft. Das Ligationsgemisch wurde zur Transformation von *E. coli* verwendet. Die Anwesenheit und Orientierung des Fragments wurde durch Spaltung eines Plasmidpräparats aus einer Transformante mit Restriktionsenzymen verifiziert. Die Sequenzanalyse wurde am doppelsträngigen Plasmid unter Anwendung des von Sanger entwickelten Didesoxy-Kettenterminationsverfahrens durchgeführt. Das Plasmid erhielt die Bezeichnung pAHL254N und ist mit Ausnahme des veränderten Codons mit pAHL identisch.

**Beispiel 4: Konstruktion von Plasmiden, die andere Varianten von *Humicola*-Lipase exprimieren**

Die folgenden Mutanten wurden unter Anwendung des in Beispiel 3 beschriebenen Verfahrens konstruiert, mit der Ausnahme, daß andere Restriktionsenzyme zur Verdauung des PCR-Produkts verwendet wurden und der Vektor für die Rekombination des mutierten Fragments verwendet wurde. Die Plasmidbezeichnungen und die für die Modifikation verwendeten Primer sind nachstehend aufgelistet:

Plasmidbezeichnung	Primersequenz
pAHL254K	5' -GTGCGCAGGGATCTCGGAATGTT-3'
pAHL254R	5' -GTGCGCAGGGATTCTCGGGAATGTT-3'
pAHL242N	5' -GCCGCCGGTGGCGTTGATGCCTTCTAT-3'
pAHL242N/D254N	5' -GTGCGCAGGGATGTTGGAAATGTTAGGCTGG- TTATTGCCGCCGGTGGCGTTGATGCCTTCTAT-3'
pAHLE87R	5' -CCCGATCCAGTTCTTATCGATCGAGAGCCCGG-3'
pAHLE87K	5' -CGATCCAGTTCTTATCGATCGAGAGCCACGG-3'

**Beispiel 5: Konstruktion von Lipase-Varianten durch Kombination von verfügbaren Mutanten**

Die folgenden Mutanten wurden konstruiert, indem man die Plasmidfragmente der vorstehend konstruierten Mutanten vereinigte. Beispielsweise wurde pAHLE87K/D254K konstruiert, indem man das BamHI/BstXI-Restriktionsfragment aus pAHLE87K isolierte und das Fragment in mit BamHI und BstXI verdautes pAHLD254K inserierte:

**Plasmid**

pAHLE87K/D254K  
 pAHLE87Q/D254N/D242N/E210Q  
 pAHLE87Q/D242N/E210Q  
 pAHLR209A/E210A/D96L  
 pAHLR209A/E210Q/E56Q  
 pAHLE210Q/D242N/D254N  
 pAHLE87Q/E210Q/D242N

**Beispiel 6**

**Transformation von *Aspergillus oryzae* (allgemeines Verfahren)**

100 ml YPD (Sherman et al., Methods in Yeast Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory, 1981) wurden mit Sporen von *A. oryzae* beimpft und unter Schütteln etwa 24 Stunden inkubiert. Das Myzel wurde unter Filtration durch Miracloth geerntet und mit 200 ml 0,6 M MgSO<sub>4</sub> gewaschen. Sodann wurde das Myzel in 15 ml 1,2 M MgSO<sub>4</sub>, 10 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH-Wert 5,8, suspendiert. Die Suspension wurde auf Eis gekühlt und mit 1 ml Puffer mit einem Gehalt an 120 mg Novozym<sup>R</sup> 234, Charge 1687, versetzt. Nach 5 min wurde 1 ml Lösung mit einem Gehalt an 12 mg BSA pro ml (Sigma Typ H25) zugegeben. Die Inkubation wurde unter mäßigem Bewegen 1,5-2,5 Stunden bei 37°C fortgesetzt, bis eine große Anzahl von Protoplasten in einer unter dem Mikroskop betrachteten Probe sichtbar war.

Die Suspension wurde durch Miracloth filtriert. Das Filtrat wurde in ein steriles Röhrchen übertragen und mit 5 ml 0,6 M Sorbit, 100 mM Tris-HCl, pH-Wert = 7,0 überschichtet. Die Zentrifugation wurde 15 Minuten bei 1000 g durchgeführt. Die Protoplasten wurden oben vom MgSO<sub>4</sub>-Kissen gewonnen. 2 Volumenteile STC (1,2 M Sorbit, 10 mM Tris-HCl, pH-Wert 7,5, 10 mM CaCl<sub>2</sub>) wurden zu der Protoplastensuspension gegeben. Das Gemisch wurde 5 min bei 1000 g zentrifugiert. Das Protoplastenpellet wurde in 3 ml STC resuspendiert und pelletiert. Dieser Vorgang wurde wiederholt. Schließlich wurden die Protoplasten in 0,2-1 ml STC resuspendiert.

100  $\mu$ l Protoplastensuspension wurden mit 5-25  $\mu$ g p3SR2 (ein das *A. nidulans*-amdS-Gen tragendes Plasmid, beschrieben von Hynes et al., Mol. and Cel. Biol. Bd. 3, Nr. 8 (1983), S. 1430-1439) in 10  $\mu$ l STC vermischt. Das Gemisch wurde 25 min bei Raumtemperatur stehengelassen. 0,2 ml 60% PEG 4000 (BDH 29576), 10 mM CaCl<sub>2</sub> und 10 mM Tris-HCl, pH-Wert 7,5, wurden zugegeben und sorgfältig vermischt (2 mal). Schließlich wurden 0,85 ml der gleichen Lösung zugegeben und sorgfältig vermischt. Das Gemisch wurde 25 min bei Raumtemperatur stehengelassen und 15 min bei 2500 g zentrifugiert. Das Pellet wurde in 2 ml 1,2 M Sorbit resuspendiert. Nach einer weiteren Sedimentation wurden die Protoplasten auf Minimalplatten (Cove, Biochem. Biophys. Acta, Bd. 113 (1966), S. 51-56) mit einem Gehalt an 1,0 M Saccharose, pH-Wert 7,0, 10 mM Acetamid als Stickstoffquelle und 20 mM CsCl zur Hemmung des Hintergrundwachstums ausgestrichen. Nach 4- bis 7-tägiger Inkubation bei 37°C wurden Sporen entnommen, in steriles Wasser suspendiert und zur Bildung von Einzelkolonien verteilt. Dieses Verfahren wurde wiederholt. Sporen einer einzelnen Kolonie nach der zweiten Reisierung wurden als eine definierte Transformante gelagert.

#### Beispiel 7

##### Expression der Lipase-Variante D96L in *A. oryzae*

pAHLD96L wurde in *A. oryzae* IFO 4177 durch Cotransformation mit p3SR2 mit einem Gehalt an dem amdS-Gen aus *A. nidulans* gemäß Beispiel 6 transformiert. Die gemäß der Beschreibung hergestellten Protoplasten wurden mit einem Gemisch gleicher Anteile an pAHLD96L und p3SR2, wobei jeweils 5  $\mu$ g verwendet wurden, inkubiert. 9 Transformanten, die Acetamid als alleinige Stickstoffquelle verwerten konnten, wurden 2 mal reisert. Nach 3-tägigem Wachstum auf YPD wurden die Kulturüberstände unter Anwendung des in Beispiel 8 beschriebenen Tests auf Lipase-Aktivität (Reinigung von erfindungsgemäßen Lipase-Varianten) analysiert. Die beste Transformante wurde für weitere Untersuchungen ausgewählt und in einem 1 Liter fassenden Schüttelkolben auf 200 ml FG4-Medium (3% Sojamehl, 3% Maltodextrin, 1% Pepton, pH-Wert mit 4 M NaOH auf 7,0 eingestellt) 4 Tage bei 30°C gezüchtet. Unter diesen Bedingungen ergab die Transformante etwa 500 Lipase-Einheiten pro 1 ml Kultur.

Die weiteren Lipase-Varianten wurden im wesentlichen auf die vorstehend beschriebene Weise hergestellt, wobei man sich des in Beispiel 6 beschriebenen allgemeinen Verfahrens bediente.

**Beispiel 8****Reinigung der erfindungsgemäßen Lipase-Varianten****Test auf Lipase-Aktivität:**

Ein Substrat für Lipase wurde durch Emulgieren von Glycerintributyrat (Merck) unter Verwendung von Gummi arabicum als Emulgator hergestellt. Die Lipase-Aktivität wurde unter Anwendung des pH-Stat-Verfahrens beim pH-Wert 7 getestet. 1 Einheit Lipase-Aktivität (LU/mg) wurde als die Menge definiert, die zur Freisetzung von 1 Mikromol Fettsäure pro Minute erforderlich war.

**Stufe 1:** Der Fermentationsüberstand wird zentrifugiert. Der Niederschlag wird verworfen. Der pH-Wert des Überstands wird auf 7 eingestellt. Sodann wird allmählich ein gleiches Volumen an kaltem 96% Ethanol zugegeben. Man lässt das Gemisch 30 Minuten in einem Eisbad stehen. Sodann wird zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen.

**Stufe 2:** Ionenaustauschchromatographie. Der Überstand wird filtriert und auf eine mit 50 mM Tris-Acetat-Puffer vom pH-Wert 7 äquilierte DEAE-fast flow (Pharmacia R)-Säule aufgesetzt. Die Säule wird mit dem gleichen Puffer gewaschen, bis die Absorption bei 280 nm weniger als 0,05 OD beträgt. Die gebundene enzymatische Aktivität wird mit einem linearen Salzgradienten im gleichen Puffer (0 bis 0,5 M NaCl) unter Einsatz von 5 Säulenvolumina eluiert. Die Fraktionen mit der enzymatischen Aktivität werden vereinigt.

**Stufe 3:** Hydrophobe Chromatographie. Die Molarität des die enzymatische Aktivität enthaltenden Pools wird durch Zugabe von festem Ammoniumacetat auf 0,8 M eingestellt. Das Enzym wird auf eine TSK-Gel-Butyl-Toyopearl 650 C-Säule (Produkt der Fa. Tosoh Corporation, Japan), die mit 0,8 M Ammoniumacetat voräquilibriert worden ist, aufgesetzt. Das ungebundene Material wird mit 0,8 M Ammoniumacetat ausgewaschen. Das gebundene Material wird mit destilliertem Wasser eluiert.

**Stufe 4:** Der die Lipase-Aktivität enthaltende Pool wird mit Wasser zur Einstellung einer Leitfähigkeit von 2 mS und eines pH-Werts von 7 verdünnt. Der Pool wird auf eine High performance Q-Sepharose (Pharmacia)-Säule, die mit 50 mM Tris-Acetat-Puffer vom pH-Wert 7 voräquilibriert worden ist, aufgesetzt. Das gebundene Enzym wird mit einem linearen Salzgradienten eluiert.

**Beispiel 9****Wäschverhalten von erfindungsgemäßen Lipase-Varianten**

Das Waschverhalten von erfindungsgemäßen *Humicola lanuginosa*-Lipase-Varianten wurde auf der Basis der Enzymdosierung in mg Protein pro Liter (gemäß dem OD<sub>280</sub>-Wert) im Vergleich mit Wildtyp-*H. lanuginosa*-Lipase bewertet.

Waschversuche wurden in 150 ml-Bechergläsern, die in einem thermostatisierten Wasserbad standen, durchgeführt. Die Bechergläser wurden mit dreieckigen Magnetrührstäben gerührt.

Folgende Versuchsbedingungen wurden eingehalten:

**Verfahren:** 3 Zyklen unter Trocknung über Nacht  
; zwischen den einzelnen Zyklen

**Waschflüssigkeit:** 100 ml pro Becherglas

**Proben:** 6 Proben (3,5 x 3,5 cm) pro Becherglas

**Textiler Werkstoff:** 100% Baumwolle, Testgewebe, Stil #400

**Flecken:** Schweinefett, gefärbt mit Sudan-Rot  
(0,75 mg Farbstoff/g Fett). 6 µl auf 70°C erwärmtes Fett wurden auf die Mitte der einzelnen Stoffproben aufgebracht. Nach Aufbringen des Fleckens wurden die Stoffproben 30 Minuten in einem Trockenschrank auf 75°C erwärmt. Sodann wurden die Stoffproben über Nacht bei Raumtemperatur gelagert, bevor der erste Waschvorgang durchgeführt wurde.

**Waschmittel:** LAS (Nansa 1169/P, 30% a.m.) 1,17 g/l  
AEO (Dobanol 25-7) 0,15 g/l  
Natriumtriphosphat 1,25 g/l  
Natriumsulfat 1,00 g/l  
Natriumcarbonat 0,45 g/l  
Natriumsilicat 0,15 g/l

**pH-Wert:** 10,2

**Lipase-Konzentration:** 0,075, 0,188, 0,375, 0,75 und 2,5 mg Lipase-Protein pro Liter

**Zeit:** 20 Minuten

**Temperatur:** 30°C

**Spülung:** 15 Minuten in laufendem Leitungswasser

**Trocknung:** Über Nacht bei Raumtemperatur (-20°C, 30-50% relative Luftfeuchtigkeit)

Bewertung: nach dem dritten Waschvorgang wurde das Reflexionsvermögen bei 460 nm gemessen.

**Ergebnisse**

Die Dosis-Wirkungs-Kurven wurden für die Lipase-Varianten und für die native *H. lanuginosa*-Lipase verglichen. Die Dosis-Wirkungs-Kurven wurden durch Anpassung der gemessenen Daten an die folgende Gleichung berechnet:

$$\Delta R = \Delta R_{\max} \frac{C^{0,5}}{K + C^{0,5}} \quad (I)$$

worin  $\Delta R$  die in Reflexionseinheiten angegebene Wirkung bedeutet,

$C$  die Enzymkonzentration (mg/Liter) bedeutet,

$\Delta R_{\max}$  eine die maximale Wirkung ausdrückende Konstante bedeutet,

$K$  eine Konstante ist, wobei  $K^2$  die Enzymkonzentration angibt, bei der die Hälfte der maximalen Wirkung erreicht wird.

Auf der Grundlage der charakteristischen Konstanten  $\Delta R_{\max}$  und  $K$ , die für die einzelnen Lipase-Varianten sowie für die Wildtyp-Lipase gefunden wurden, wurden die Verbesserungsfaktoren berechnet. Der Verbesserungsfaktor gemäß folgender Definition

$$f_{\text{Verbesserung}} = C_{\text{WT}}/C \quad (II)$$

gibt die Menge des Proteins der Lipase-Variante an, die zur Erzielung der gleichen Wirkung, wie sie mit 0,25 mg/Liter des Vergleichswildtyp-Proteins ( $C_{\text{WT}}$ ) erhalten wird, benötigt wird.

Somit erfolgte das Verfahren zur Berechnung des Verbesserungsfaktors folgendermaßen:

1) Die Wirkung des Wildtyp-Proteins bei 0,25 mg/Liter ( $\Delta R_{\text{Wildtyp}}$ ) wurde mittels Gleichung (I) berechnet.

2) Die Konzentration der Lipase-Variante, die die gleiche Wirkung wie der Wildtyp bei 0,25 mg/Liter ergab, wurde mittels folgender Gleichung berechnet:

$$C = \frac{\Delta R_{\text{Wildtyp}}}{\Delta R_{\max}(\text{Variante}) - \Delta R_{\text{Wildtyp}}}^2 \quad (III)$$

3) Der Verbesserungsfaktor wurde mittels der Gleichung (II) berechnet.

Die Ergebnisse sind in folgender Tabelle 1 zusammengestellt.

Tabelle 1

Variante	Verbesserungsfaktor
D96L	4,4
D111L	1,0
E87A	1,0
E56A	1,6
E56Q	2,6
R209A	1,1
D242N	1,7
R209A+E210A	1,9
R209A+E210A+D96L	2,8
E210Q+D242N+D254N	1,8
R209A+E210A+D96L+E56Q	1,5

Aus Tabelle 1 geht hervor, daß die Lipase-Varianten R209A+E210A, E56Q und D96L ein erheblich besseres Waschverhalten als die Wildtyp-Lipase aufweisen. Dies kann möglicherweise auf die verringerte negative Ladung und auf die erhöhte Hydrophobizität dieser Varianten zurückzuführen sein, was zu einer erhöhten Adsorption während des Waschvorgangs und infolgedessen zu einer höheren Aktivität während der Trocknungsphase führt. Das Verhalten der Lipase-Varianten E87A, D111L und R209A ist gleichwertig mit dem des Wildtyp-Enzyms.

#### Beispiel 10

##### Erhöhte Thermostabilität von Lipase-Varianten

Die Thermostabilität von ausgewählten Varianten von *H. lanuginosa*-Lipase wurde durch Differentialscanningkalorimetrie (DSC) geprüft. Mit dieser Technik wird die Temperatur der thermischen Denaturierung  $T_d$  bestimmt, indem man die Enzymlösung mit konstanter programmierte Geschwindigkeit erwärmt.

##### Versuche

Für die Untersuchungen wurde der Differentialscanningkalorimeter MC-2D der Fa. MicroCal Inc. verwendet. 50 mM Pufferlösungen mit folgenden pH-Werten wurden hergestellt: 4 (Acetat), 7 (Tris-Acetat), 10 (Glycin). Die Enzymkonzentration lag im Bereich von 0,6 bis 0,9 mg/ml. Für jeden Versuch wurde ein Gesamtvolumen von etwa 1,2 ml herangezogen. Sämtliche Proben wurden mit einer Abtastgeschwindigkeit von 90°C/h von 5°C auf 95°C erwärmt.

**Ergebnisse:**

Die Ergebnisse für den Wildtyp und die ausgewählten Mutanten sind in der nachstehenden Tabelle zusammengestellt.

Nr.	Mutation	pH-Wert 4		pH-Wert 7		pH-Wert 10	
		T <sub>d</sub>	dT <sub>d</sub>	T <sub>d</sub>	dT <sub>d</sub>	T <sub>d</sub>	dT <sub>d</sub>
WT	-	58,9	-	74,7	-	69,3	-
1	F211A	60,2	+1,3	75,8	+1,1	70,3	+1,0
2	T267R	59,4	+0,5	75,7	+1,0	70,0	+0,7
3	D111N	58,3	-0,6	75,6	+0,9	69,9	+0,6
4	F211L	57,8	-1,1	74,8	0,1	69,4	0,1

Anmerkung: dT<sub>d</sub> bedeutet, daß die Veränderungen der Thermostabilität ein Ergebnis der Mutation ist.

**Beispiel 11**

Lagerstabilität von *H. lanuginosa*-Lipase-Varianten in einem flüssigen Waschmittel

Verschiedene Varianten wurden in einem flüssigen Modellwaschmittel der folgenden Zusammensetzung getestet:

% (Gew./Gew.)		
Anionisch	LAS	10
	AS	1
	Seife	14
Nicht-Ionogen	AEO	13
Lösungsmittel	1,2-Propandiol	3
	Ethanol	5
Puffer	TEA	6
Builder	Natriumcitrat	1
Neutralisiermittel	NaOH	2
Stabilisator und dergl. SXS		1
	Ca <sup>2+</sup>	0,0025
	Phosphonat	0,4
	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,2
Wasser	ad 100%	
pH-Wert	8 oder 10	

1000 LU pro Gramm Waschmittel wurden zugegeben. In einigen Proben wurden 0,025 AUS/g (Alcalase<sup>R</sup>) zugegeben. Die Proben wurden nach folgendem Schema gelagert (jeweils Dreifachversuch):

Lagertemperatur	-18°C	30°C
-----------------	-------	------

**Waschmittel**

pH-Wert 8, keine Protease	2 & 7 Tage	2 & 7 Tage
---------------------------	------------	------------

pH-Wert 8, 0,025 AUS/g	2 Tage
------------------------	--------

pH-Wert 10, keine Protease	7 Tage	7 Tage
----------------------------	--------	--------

Nach dieser Inkubation wurden die Proben gemäß dem LU-Verfahren (Novo Nordisk AF 95.5) analysiert.

Unter der Annahme, daß der Abfall der Lipase-Aktivität einer Kinetik 1. Ordnung folgt, läßt sich die Geschwindigkeitskonstante der Abnahme folgendermaßen bestimmen:  $A(t) = A_0 \cdot \exp(-k \cdot t)$  worin  $A(t)$  die Enzymaktivität zum Zeitpunkt  $t$  bedeutet,  $A_0$  die anfängliche Aktivität bedeutet und  $k$  die Geschwindigkeitskonstante 1. Ordnung bedeutet.

Für das Waschmittel mit einem Gehalt an Protease läßt sich die Geschwindigkeitskonstante für die Proteolyse folgendermaßen berechnen:  $A(t) = A_0 \cdot \exp(-[k+k_p] \cdot t)$

worin  $k_p$  die Geschwindigkeitskonstante der Proteolyse bedeutet und  $k$  aus den Stabilitätsdaten im Waschmittel ohne Protease berechnet wird.

In jedem Versuch wurde die Wildtyp-*H. lanuginosa*-Lipase zum Vergleich mitgeführt. Ein Vergleich der Varianten mit dem Wildtyp wird nur bei einem Versuch vorgenommen, um die Variationsunsicherheit zwischen den Versuchen zu verringern. Nachstehend sind die Ergebnisse zusammengestellt. Die relative Verbesserung einer Variante gegenüber dem Wildtyp wird folgendermaßen angegeben:  $IF_x = k_{wt}/k_x$  worin  $IF$  den Verbesserungsfaktor bedeutet,  $k_{wt}$  die Geschwindigkeitskonstante des Abfalls des Wildtyps (bei den gegebenen Bedingungen) bedeutet und  $k_x$  die entsprechende Geschwindigkeitskonstante der in Frage stehenden Variante im gleichen Versuch bedeutet.

$IF$  drückt die relative Verbesserung als Halbwertszeit aus ( $IF_x = 2$  bedeutet, daß die Halbwertszeit der Variante  $x$  beim gleichen Versuch doppelt so lang wie die des Wildtyps ist).

Auf der Grundlage einer Ermittlung der Variationen von Wiederholungsansätzen innerhalb eines Versuchs wird ein  $IF$ -Wert  $<0,7$  oder  $IF >1,3$  als signifikant angesehen. Die Einheit von  $k$  beträgt  $(\text{Tag})^{-1}$ .

Variante	Versuch Nr.	pH-Wert 8		pH-Wert 8 + Alkalase		pH-Wert 10	
		kein Protein k*)	IF*)	k <sub>p</sub>	IF	k	IF
Wildtyp	3	0,02		0,48		0,19	
	5	0,02		0,40		0,16	
	6	0,00		0,34		0,09	
	7	0,01		0,52		0,22	
	8 a	0,01		0,50		0,09	
	8 b	0,01		0,52		0,07	
D96N	3	0,00		0,21	2,3	0,15	1,3
	5	0,02		0,26	1,6	n.d.	
D111N	3	0,00		0,50	1,0	0,16	1,2
	5	0,02		0,31	1,3	0,13	1,2
E56Q	3	0,01		0,22	2,2	0,14	1,4
D96L	6	0,01		0,17	2,0	0,08	1,2
	7	0,00		0,23	2,3	0,09	2,6
R209A/E210A/D96L	7	0,02		0,36	1,4	0,10	2,3
E210Q/D242N/D254N	7	0,02		0,49	1,0	n.d.	

\*) k im Detergens beim pH-Wert 8 ist in sämtlichen Fällen sehr niedrig.

Aufgrund dieser kurzen Lagerzeit (7 Tage, etwa 90% Restaktivität) ist die Bestimmung nicht sehr genau. Daher wird der IF-Wert nicht berechnet.

n.d. = nicht bestimmt

Zusammenfassend lässt sich feststellen, daß eine Anzahl der getesteten Varianten eine verbesserte Beständigkeit gegen einen proteolytischen Abbau aufwies. Sie wiesen fast alle eine verbesserte Beständigkeit gegenüber alkalischen Bedingungen auf.

#### Beispiel 12

##### Spezifische Aktivität

Eine höhere spezifische Aktivität (Mengen an Substratmolekülen, die pro Zeiteinheit und pro Einheitsmenge gespalten wurden) im Vergleich zum Wildtyp (wt) wurde für die nachstehend angegebenen Lipase-Varianten gemessen. Dies bedeutet, daß diese Lipasen ein überlegenes Verhalten bei der Hydrolyse des vorliegenden Substrats aufweisen.

Die Lipasen wurden auf die gleiche Weise fermentiert und gereinigt. Die gereinigten Lipasen wurden in einem standardmäßigen LU-Test getestet (analytisches Verfahren, interne Novo Nordisk-Nr. AF 96/6-GB 1991.02.07).

Die Probe wurde 2 mal analysiert. Die Mittelwerte sind tabellarisch aufgeführt. Die Proteinmenge wurde durch Messung der optischen Dichte an ein Shimadzu-Spektrophotometer bei der Wellenlänge 280 nm gemessen. Die Probe wurde als rein angesehen, wenn der Verhältniswert von OD<sub>280</sub>/OD<sub>260</sub> größer als 1,6 war und sich gleichzeitig bei der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese eine einzige Bande ergab.

<i>Humicola lanuginosa</i>	Spezifische Aktivität LU/OD <sub>280</sub>
D111N	4290*
E56A	4890*
L206V	4750
R209*/E210*	6686
R209A/E210A/D96L	4818
wt	3790

\*nur 1 mal getestet

#### SEQUENZLISTE

##### (1) ALLGEMEINE ANGABEN:

###### (i) ANMELDER:

Novo Nordisk A/S

###### (ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: Lipase-Varianten

###### (iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 2

###### (iv) KORRESPONDENZANSCHRIFT:

(A) ADRESSAT: Novo Nordisk A/S

(B) STASSE: Novo Alle

(C) ORT: Bagsvaerd

(E) LAND: Dänemark

(F) POSTLEITZAHL: 2880

###### (v) COMPUTERLESBARE FASSUNG:

(A) DATENTRÄGER: Floppy Disk

(B) COMPUTER: IBM PC kompatibel

(C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS

(D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.25

###### (vi) DATEN DER VORLIEGENDEN ANMELDUNG:

###### (A) ANMELDENUMMER:

###### (B) ANMELDETAG:

###### (C) KLASSEFIKATION:

(vii) DATEN DER VORANMELDUNG:

(A) ANMELDENUMMER: DK 2196/90

(B) ANMELDETAG: 13. SEPTEMBER 1990

(vii) DATEN DER VORANMELDUNG:

(A) ANMELDENUMMER: DK 2194/90

(B) ANMELDETAG: 13. SEPTEMBER 1990

(vii) DATEN DER VORANMELDUNG:

(A) ANMELDENUMMER: DK 2195/90

(B) ANMELDETAG: 13. SEPTEMBER 1990

(viii) ANGABEN ÜBER DEN ANWALT/VERTRETER:

(A) NAME: Thalsoe-Madsen, Birgit

(C) AKTENZEICHEN: 3520.204-WO

(ix) TELEKOMMUNIKATIONSANGABEN:

(A) TELEFON: +45 4444 8888

(B) TELEFAX: +45 4449 3256

(C) TELEX: 37304

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 1:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 918 Basenpaare

(B) ART: Nucleinsäure

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: Humicola lanuginosa

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS

(B) Lage: 1..873

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

ATG AGG AGC TCC CTT GTG CTG TTC TTT GTC TCT GCG TGG ACG GCC TTG 48  
 Met Arg Ser Ser Leu Val Leu Phe Phe Val Ser Ala Trp Thr Ala Leu  
 1 5 10 15

GCC AGT CCT ATT CGT CGA GAG GTC TCG CAG GAT CTG TTT AAC CAG TTC 96  
 Ala Ser Pro Ile Arg Arg Glu Val Ser Gln Asp Leu Phe Asn Gln Phe  
 20 25 30

AAT CTC TTT GCA CAG TAT TCT GCA GCC GCA TAC TGC GGA AAA AAC AAT 144  
 Asn Leu Phe Ala Gln Tyr Ser Ala Ala Ala Tyr Cys Gly Lys Asn Asn  
 35 40 45

GAT GCC CCA GCT GGT ACA AAC ATT ACG TGC ACG GGA AAT GCC TGC CCC 192  
 Asp Ala Pro Ala Gly Thr Asn Ile Thr Cys Thr Gly Asn Ala Cys Pro  
 50 55 60

GAG GTA GAG AAG GCG GAT GCA ACG TTT CTC TAC TCG TTT GAA GAC TCT 240  
 Glu Val Glu Lys Ala Asp Ala Thr Phe Leu Tyr Ser Phe Glu Asp Ser  
 65 70 75 80

GGA GTG GGC GAT GTC ACC GGC TTC CTT GCT CTC GAC AAC ACG AAC AAA 288  
 Gly Val Gly Asp Val Thr Gly Phe Leu Ala Leu Asp Asn Thr Asn Lys  
 85 90 95

TTG ATC GTC CTC TCT TTC CGT GGC TCT CGT TCC ATA GAG AAC TGG ATC 336  
 Leu Ile Val Leu Ser Phe Arg Gly Ser Arg Ser Ile Glu Asn Trp Ile

100 105 110

GGG AAT CTT AAC TTC GAC TTG AAA GAA ATA AAT GAC ATT TGC TCC GGC 384  
 Gly Asn Leu Asn Phe Asp Leu Lys Glu Ile Asn Asp Ile Cys Ser Gly  
 115 120 125

TGC AGG GGA CAT GAC GGC TTC ACT TCG TCC TGG AGG TCT GTA GCC GAT 432  
 Cys Arg Gly His Asp Gly Phe Thr Ser Ser Trp Arg Ser Val Ala Asp  
 130 135 140

ACG TTA AGG CAG AAG GTG GAG GAT GCT GTG AGG GAG CAT CCC GAC TAT 480  
 Thr Leu Arg Gln Lys Val Glu Asp Ala Val Arg Glu His Pro Asp Tyr  
 145 150 155 160

CGC GTG GTG TTT ACC GGA CAT AGC TTG GGT GGT GCA TTG GCA ACT GTT 528  
 Arg Val Val Phe Thr Gly His Ser Leu Gly Gly Ala Leu Ala Thr Val  
 165 170 175

GCC GGA GCA GAC CTG CGT GGA AAT GGG TAT GAT ATC GAC GTG TTT TCA 576  
 Ala Gly Ala Asp Leu Arg Gly Asn Gly Tyr Asp Ile Asp Val Phe Ser  
 180 185 190

TAT GGC GCC CCC CGA GTC GGA AAC AGG GCT TTT GCA GAA TTC CTG ACC 624  
 Tyr Gly Ala Pro Arg Val Gly Asn Arg Ala Phe Ala Glu Phe Leu Thr  
 195 200 205

GTA CAG ACC GGC GGA ACA CTC TAC CGC ATT ACC CAC ACC AAT GAT ATT 672  
 Val Gln Thr Gly Gly Thr Leu Tyr Arg Ile Thr His Thr Asn Asp Ile  
 210 215 220

GTC CCT AGA CTC CCG CCG CGC GAA TTC GGT TAC AGC CAT TCT AGC CCA 720  
 Val Pro Arg Leu Pro Pro Arg Glu Phe Gly Tyr Ser His Ser Ser Pro  
 225 230 235 240

GAG TAC TGG ATC AAA TCT GGA ACC CTT GTC CCC GTC ACC CGA AAC GAT 768  
 Glu Tyr Trp Ile Lys Ser Gly Thr Leu Val Pro Val Thr Arg Asn Asp  
 245 250 255

ATC GTG AAG ATA GAA GGC ATC GAT GCC ACC GGC GGC AAT AAC CAG CCT 816  
 Ile Val Lys Ile Glu Gly Ile Asp Ala Thr Gly Gly Asn Asn Gln Pro  
 260 265 270

AAC ATT CCG GAT ATC CCT GCG CAC CTA TGG TAC TTC GGG TTA ATT GGG 864  
 Asn Ile Pro Asp Ile Pro Ala His Leu Trp Tyr Phe Gly Leu Ile Gly  
 275 280 285

ACA TGT CTT TAGTGGCCGG CGCGGCTGGG TCCGACTCTA GCGAGCTCGA GATCT 918  
 Thr Cys Leu

290

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 2:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 291 Aminosäuren  
 (B) ART: Aminosäure  
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

Met Arg Ser Ser Leu Val Leu Phe Phe Val Ser Ala Trp Thr Ala Leu  
 1 5 10 15

Ala Ser Pro Ile Arg Arg Glu Val Ser Gln Asp Leu Phe Asn Gln Phe  
 20 25 30

Asn Leu Phe Ala Gln Tyr Ser Ala Ala Ala Tyr Cys Gly Lys Asn Asn  
 35 40 45

Asp Ala Pro Ala Gly Thr Asn Ile Thr Cys Thr Gly Asn Ala Cys Pro  
 50 55 60

Glu Val Glu Lys Ala Asp Ala Thr Phe Leu Tyr Ser Phe Glu Asp Ser  
 65 70 75 80

Gly Val Gly Asp Val Thr Gly Phe Leu Ala Leu Asp Asn Thr Asn Lys  
 85 90 95

Leu Ile Val Leu Ser Phe Arg Gly Ser Arg Ser Ile Glu Asn Trp Ile  
 100 105 110

Gly Asn Leu Asn Phe Asp Leu Lys Glu Ile Asn Asp Ile Cys Ser Gly  
 115 120 125

Cys Arg Gly His Asp Gly Phe Thr Ser Ser Trp Arg Ser Val Ala Asp  
 130 135 140

Thr Leu Arg Gln Lys Val Glu Asp Ala Val Arg Glu His Pro Asp Tyr  
 145 150 155 160

Arg Val Val Phe Thr Gly His Ser Leu Gly Gly Ala Leu Ala Thr Val  
 165 170 175

Ala Gly Ala Asp Leu Arg Gly Asn Gly Tyr Asp Ile Asp Val Phe Ser

180	185	190
Tyr Gly Ala Pro Arg Val Gly Asn Arg Ala Phe Ala Glu Phe Leu Thr		
195	200	205
Val Gln Thr Gly Gly Thr Leu Tyr Arg Ile Thr His Thr Asn Asp Ile		
210	215	220
Val Pro Arg Leu Pro Pro Arg Glu Phe Gly Tyr Ser His Ser Ser Pro		
225	230	235
240		
Glu Tyr Trp Ile Lys Ser Gly Thr Leu Val Pro Val Thr Arg Asn Asp		
245	250	255
Ile Val Lys Ile Glu Gly Ile Asp Ala Thr Gly Gly Asn Asn Gln Pro		
260	265	270
Asn Ile Pro Asp Ile Pro Ala His Leu Trp Tyr Phe Gly Leu Ile Gly		
275	280	285
Thr Cys Leu		
290		

**Patentansprüche**

1. Enzymatisch aktive Lipase-Variante einer parentalen Lipase, wobei die parentale Lipase eine trypsinartige katalytische Triade unter Einschluß eines aktiven Serins in einer vorwiegend hydrophoben, länglichen Bindungstasche des Lipase-Moleküls sowie eine Oberflächen-Schleifenstruktur umfaßt, die das aktive Serin bedeckt, wenn die Lipase in der inaktiven Form vorliegt, wobei diese Oberflächen-Schleifenstruktur unter Freilegen der Reste am aktiven Zentrum verschoben wird, wenn die Lipase aktiviert wird, wodurch eine Lipid-Kontaktzone innerhalb des Teils der Lipase-Struktur, die den aktiven Serinrest enthält, geschaffen wird, die durch eine Oberfläche mit erhöhter Oberflächenhydrophobizität gebildet wird, die mit dem Lipidsubstrat bei oder während der Hydrolyse in Wechselwirkung tritt, wobei die elektrostatische Ladung und/oder die Hydrophobizität der Lipid-Kontaktzone durch Deletion oder Substitution von einem oder mehreren negativ geladenen Aminosäureresten der Lipid-Kontaktzone durch neutrale oder positiv geladene Aminosäurerreste und/oder durch Substitution von einem oder mehreren neutralen Aminosäureresten durch positiv geladene Aminosäurerreste und/oder durch Deletion oder Substitution von einem oder mehreren hydrophilen Aminosäureresten durch hydrophobe Aminosäurerreste verändert ist, mit der Maßgabe, daß diese Lipase-Variante sich von Varianten einer derartigen parentalen Lipase, die aus *Pseudomonas putida* ATCC 53552 isolierbar ist, unterscheidet, worin das Gln in Position 127 durch Arg substituiert ist und/oder der Phe-Rest in Position 207 durch Thr, Gly, Lys oder Ala substituiert ist.

2. Lipase-Variante nach Anspruch 1, wobei ein oder mehr Glutaminsäure- oder Asparaginsäurereste der Lipid-Kontaktzone durch Glutamin, Asparagin, Alanin, Leucin, Valin, Serin, Threonin, Lysin oder Arginin substituiert sind.

3. Lipase-Variante nach Anspruch 1 oder 2, wobei es sich bei der parentalen Lipase um eine mikrobielle Lipase handelt.

4. Lipase-Variante nach Anspruch 3, wobei es sich bei der parentalen Lipase um eine Pilz-Lipase handelt, die vorzugsweise von einem Stamm von *Humicola* oder *Rhizomucor* abgeleitet ist.

5. Lipase-Variante nach Anspruch 4, wobei es sich bei der parentalen Lipase um eine *Rhizomucor miehei*-Lipase handelt.

6. Lipase-Variante nach Anspruch 5, wobei ein oder mehr Aminosäurereste folgendermaßen substituiert sind:

D91N,K,R,A,V,L,S,T;  
D256N,K,R,A,V,L,S,T;  
D226N,K,R,A,V,L,S,T;  
D61N,K,R,A,V,L,S,T;  
D113N,K,R,A,V,L,S,T;  
E201Q,K,R,A,V,L,S,T; oder  
D243N,K,R,A,V,L,S,T.

7. Lipase-Variante nach Anspruch 4, wobei es sich bei der parentalen Lipase um eine *Humicola lanuginosa*-Lipase handelt.

8. Lipase-Variante nach Anspruch 7, wobei ein oder mehr Aminosäurereste folgendermaßen substituiert sind:

E87Q,K,R,A,N,T,S,L,V;  
D254N,K,R,A,Q,T,S,L,V;  
D242N,K,R,A,Q,T,S,L,V;  
E210Q,K,R,A,N,T,S,L,V;  
E56Q,K,R,A,N,T,S,L,V;  
D96N,K,R,A,Q,T,S,L,V;  
D111N,K,R,A,Q,T,S,L,V;  
D62A,Q,N,T,S,K,R,L,V;  
E219A,Q,N,T,S,K,R,L,V;  
E234A,Q,N,T,S,K,R,L,V;  
E57A,Q,N,T,S,K,R,L,V;  
E99A,Q,N,T,S,K,R,L,V;  
D27A,Q,N,T,S,K,R,L,V; oder  
E239A,Q,N,T,S,K,R,L,V  
T267K,R;  
S85K,R;  
T226K,R;  
N88K,R;  
N92K,R;  
I255K,R;  
I202K,R;  
L206K,R;  
R209A;  
L259K,R;  
V203K,R; oder

L227K,R insbesondere eine Lipase-Variante mit folgenden Substitutionen:

E87Q + D254N + D242N + E210Q;  
 E87Q + D254N + E210Q;  
 D96N + E87Q + D254N;  
 R209A + E210A;  
 R209A + R210A + D96L; oder  
 E210Q + D242N + D254N.

9. Lipase-Variante nach Anspruch 3, wobei es sich bei der parentalen Lipase um eine Hefe-Lipase, die beispielsweise von einem Stamm von *Candida* abgeleitet ist, oder um eine bakterielle Lipase, die beispielsweise von einem Stamm von *Pseudomonas* abgeleitet ist, handelt.

10. DNA-Konstrukt, umfassend eine DNA-Sequenz, die für eine Lipase-Variante nach einem der Ansprüche 1 bis 9 kodiert.

11. Rekombinanter Expressionsvektor, der ein DNA-Konstrukt nach Anspruch 10 trägt.

12. Zelle, die mit einem DNA-Konstrukt nach Anspruch 10 oder mit einem Vektor nach Anspruch 11 transformiert ist.

13. Zelle nach Anspruch 12, bei der es sich um eine Pilzzelle, z.B. der Gattung *Aspergillus*, wie *A. niger*, *A. oryzae* oder *A. nidulans*, eine Hefezelle, die beispielsweise zu einem Stamm von *Saccharomyces*, wie *S. cerevisiae*, gehört, oder um eine methylotrophe Hefe der Gattungen *Hansenula*, wie *H. polymorpha* oder *Pichia*, z.B. *P. pastoris*; oder um eine bakterielle Zelle, die beispielsweise zu einem Stamm von *Bacillus*, wie *B. subtilis* oder *B. lentus* gehört, handelt.

14. Zelle nach Anspruch 12, bei der es sich um eine Pflanzenzelle handelt, die beispielsweise zu den *Solanaceae*, wie *Solanum tuberosum* oder *Nicotiana tabacum*, gehört.

15. Verfahren zur Herstellung einer Lipase-Variante nach einem der Ansprüche 1 bis 9, wobei man eine Zelle nach einem der Ansprüche 12 bis 14 unter Bedingungen züchtet oder wachsen lässt, die zur Bildung der Lipase-Variante führen, und anschließend die Lipase-Variante aus der Kultur oder Pflanze gewinnt.

16. Waschmitteladditiv, umfassend eine Lipase-Variante nach einem der Ansprüche 1 bis 9, gegebenenfalls in Form eines staubfreien Granulats, einer stabilisierten Flüssigkeit oder eines geschützten Enzyms.

17. Waschmitteladditiv nach Anspruch 16, das 0,02-200 mg Enzymprotein/g Additiv enthält.

18. Waschmitteladditiv nach Anspruch 16 oder 17, das zusätzlich ein weiteres Enzym, z. B. eine Protease, Amylase, Peroxidase und/oder Cellulase, enthält.

19. Waschmittelzusammensetzung, enthaltend eine Lipase-Variante nach einem der Ansprüche 1 bis 9.

20. Waschmittelzusammensetzung nach Anspruch 19, die zusätzlich ein weiteres Enzym, z. B. eine Protease, Amylase, Peroxidase und/oder Cellulase, enthält.

EP-B-0 548 228  
(91 916 986.2)

1/9

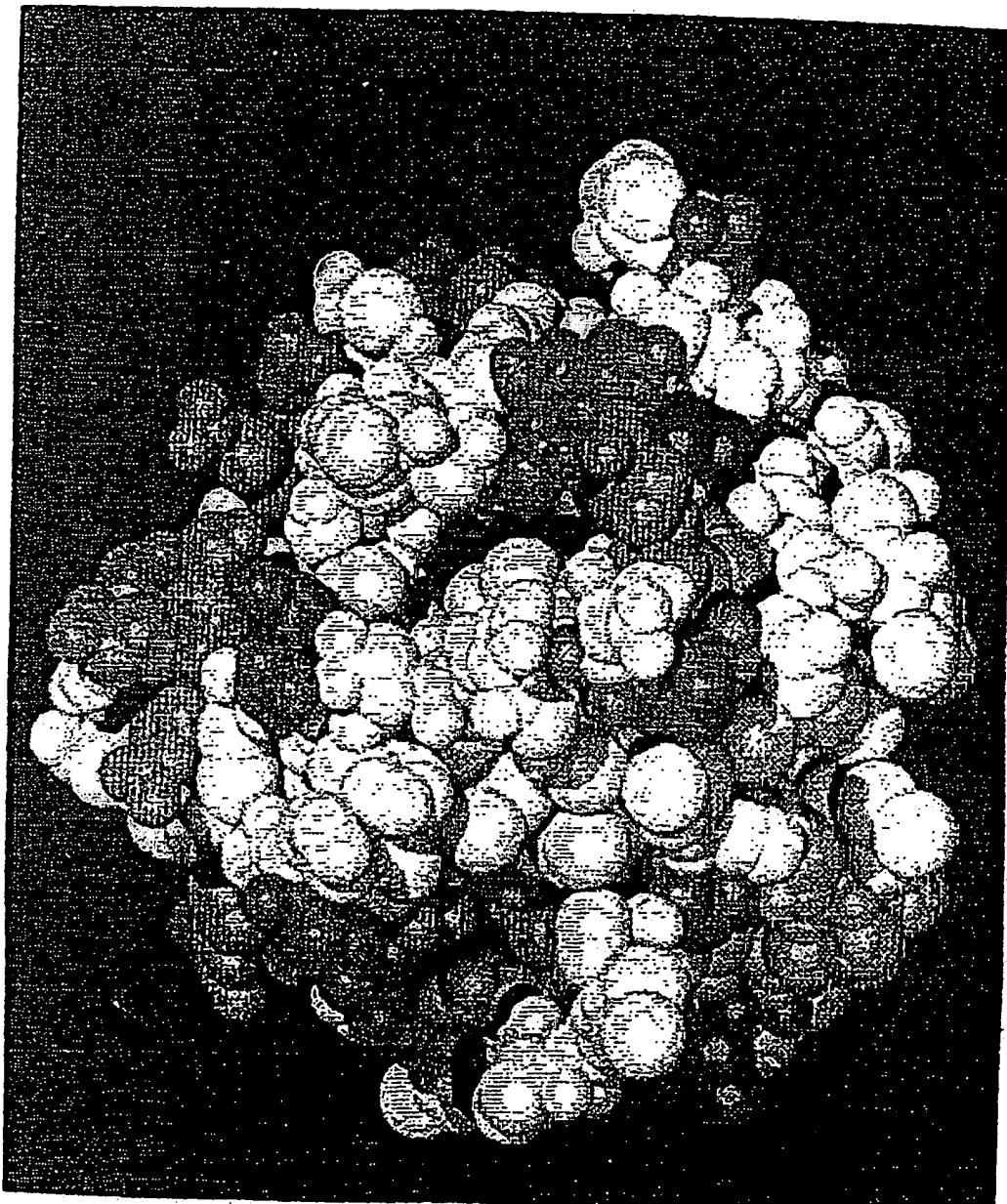
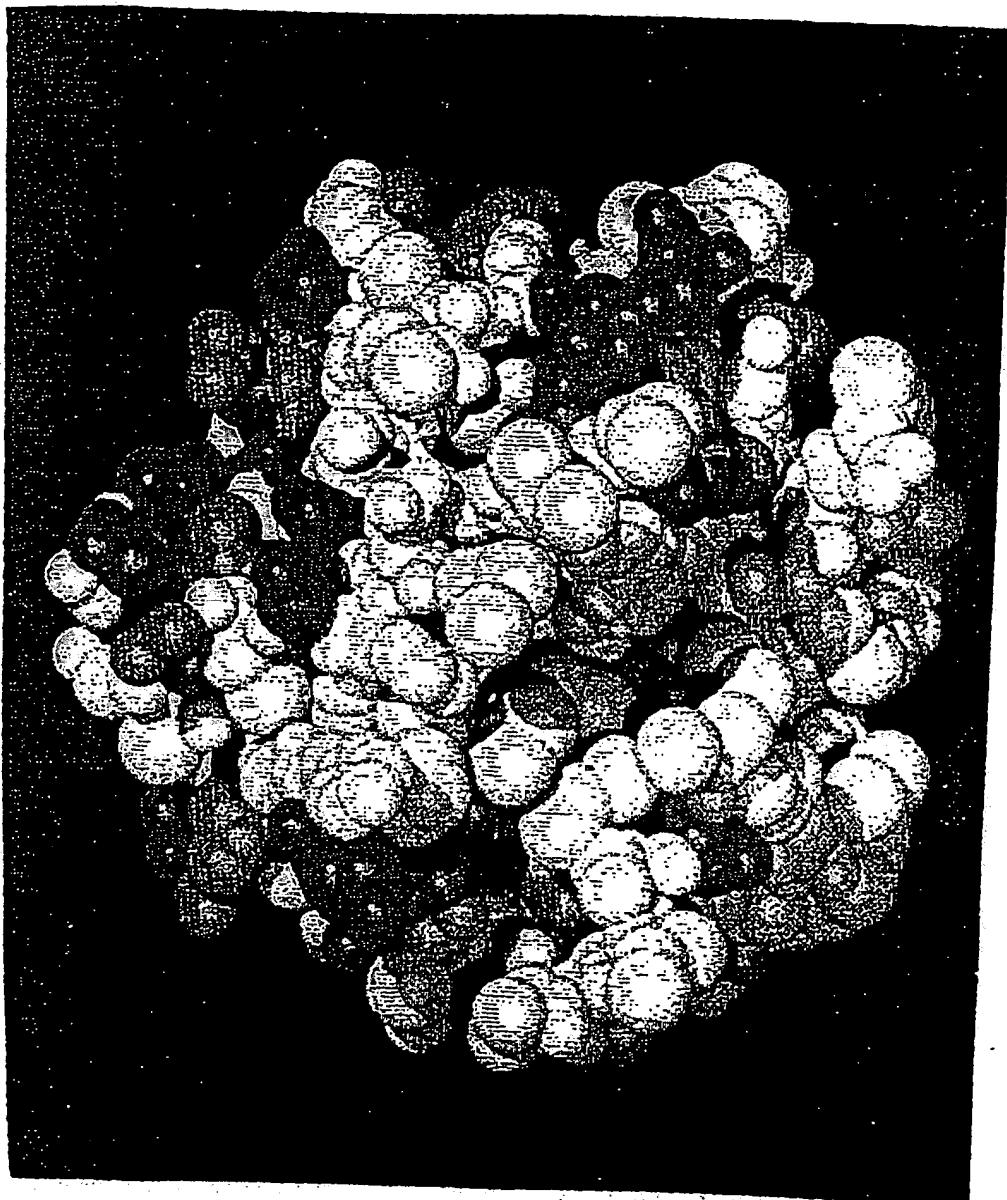


Fig. 1a

BEST AVAILABLE COPY

NZAS-0026314

2/9



BEST AVAILABLE COPY

Fig. 1b

3/9

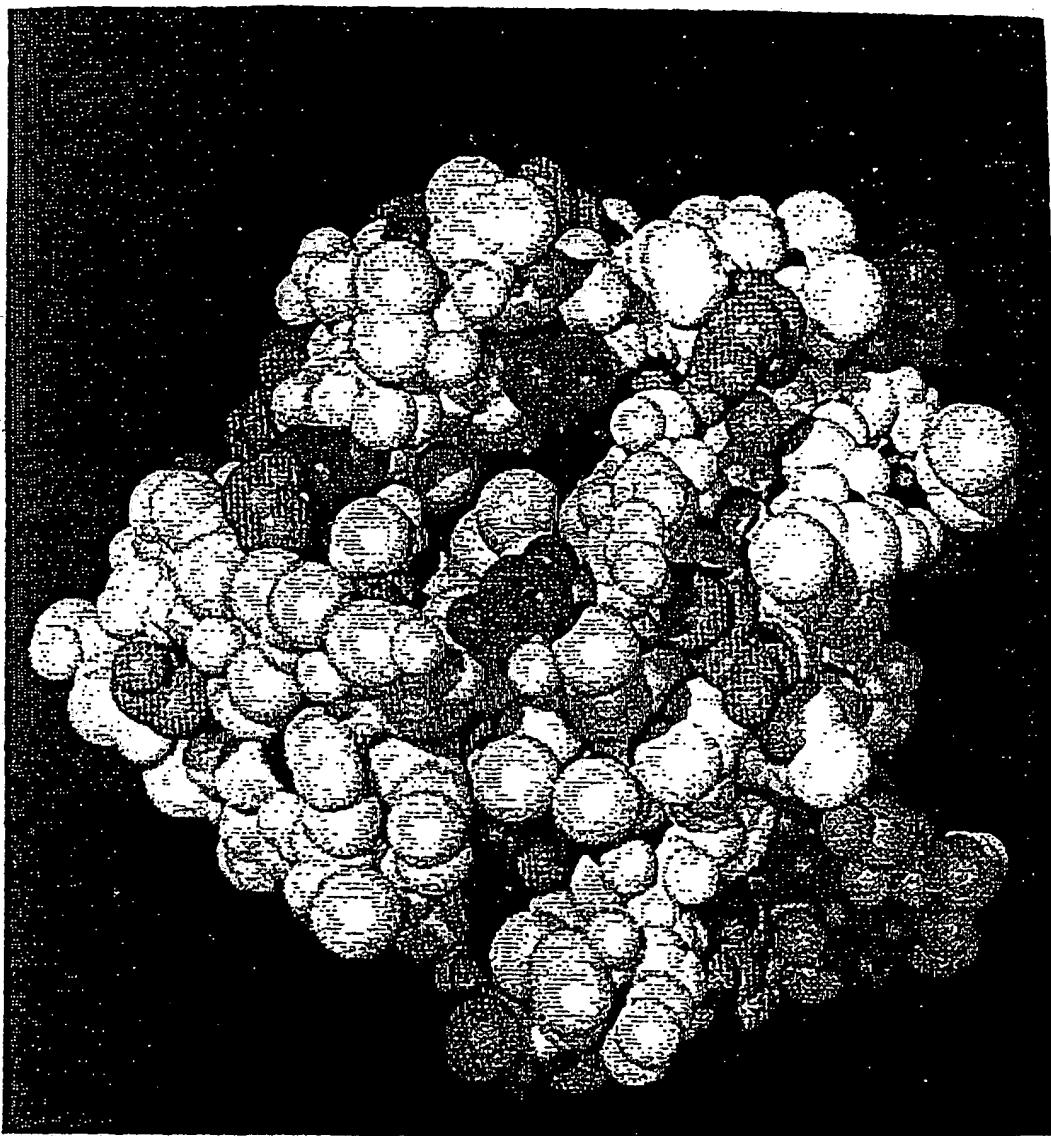


Fig. 2a

BEST AVAILABLE COPY

NZAS-0026316

4/9

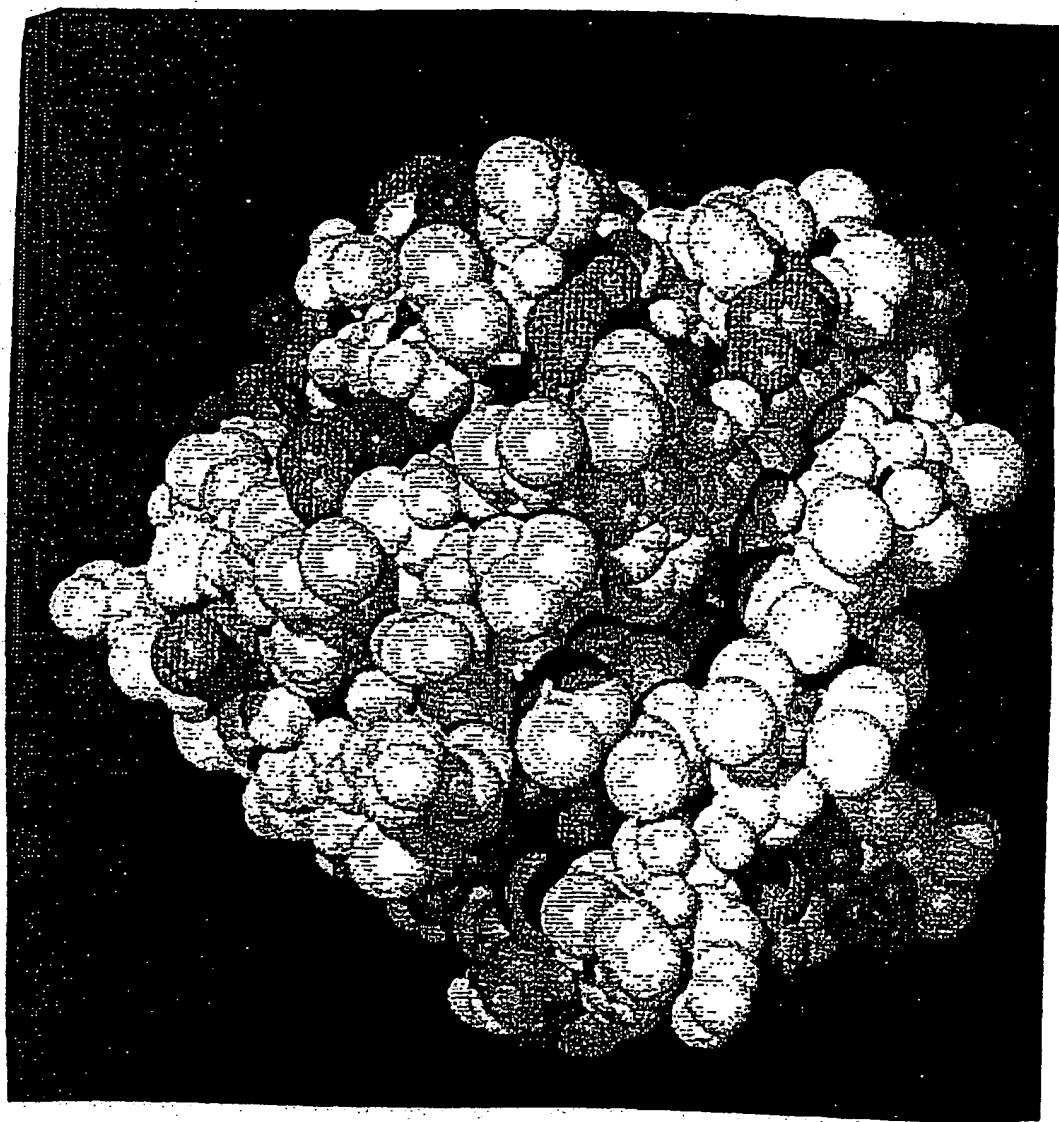
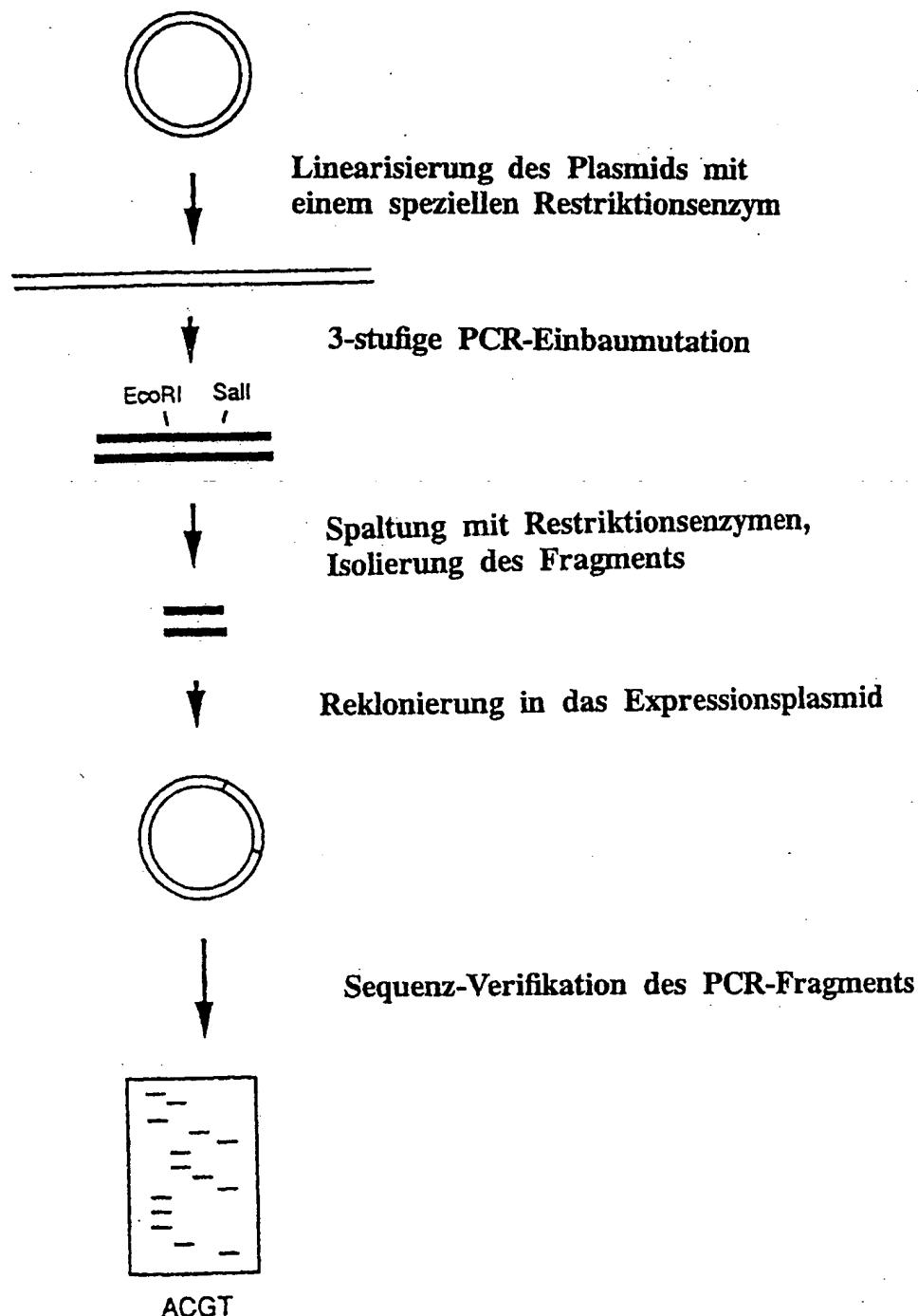


Fig. 2b

BEST AVAILABLE COPY

NZAS-0026317



BEST AVAILABLE COPY

Fig. 3

6/9

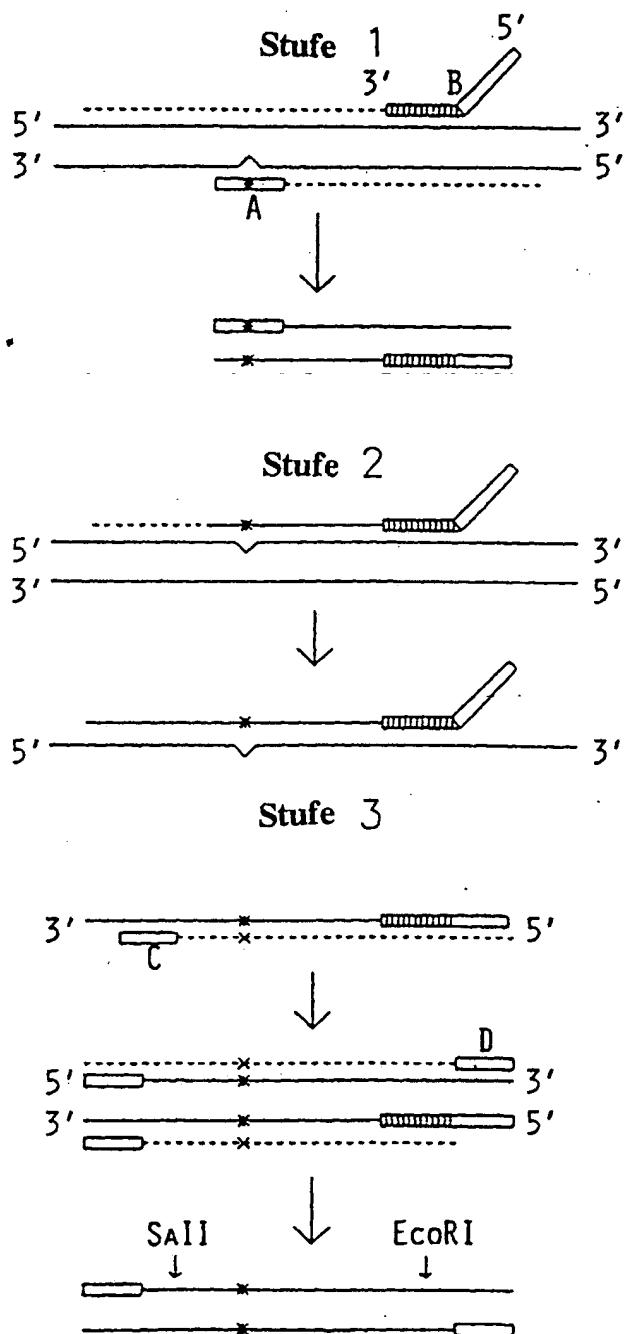


Fig. 4

7/9

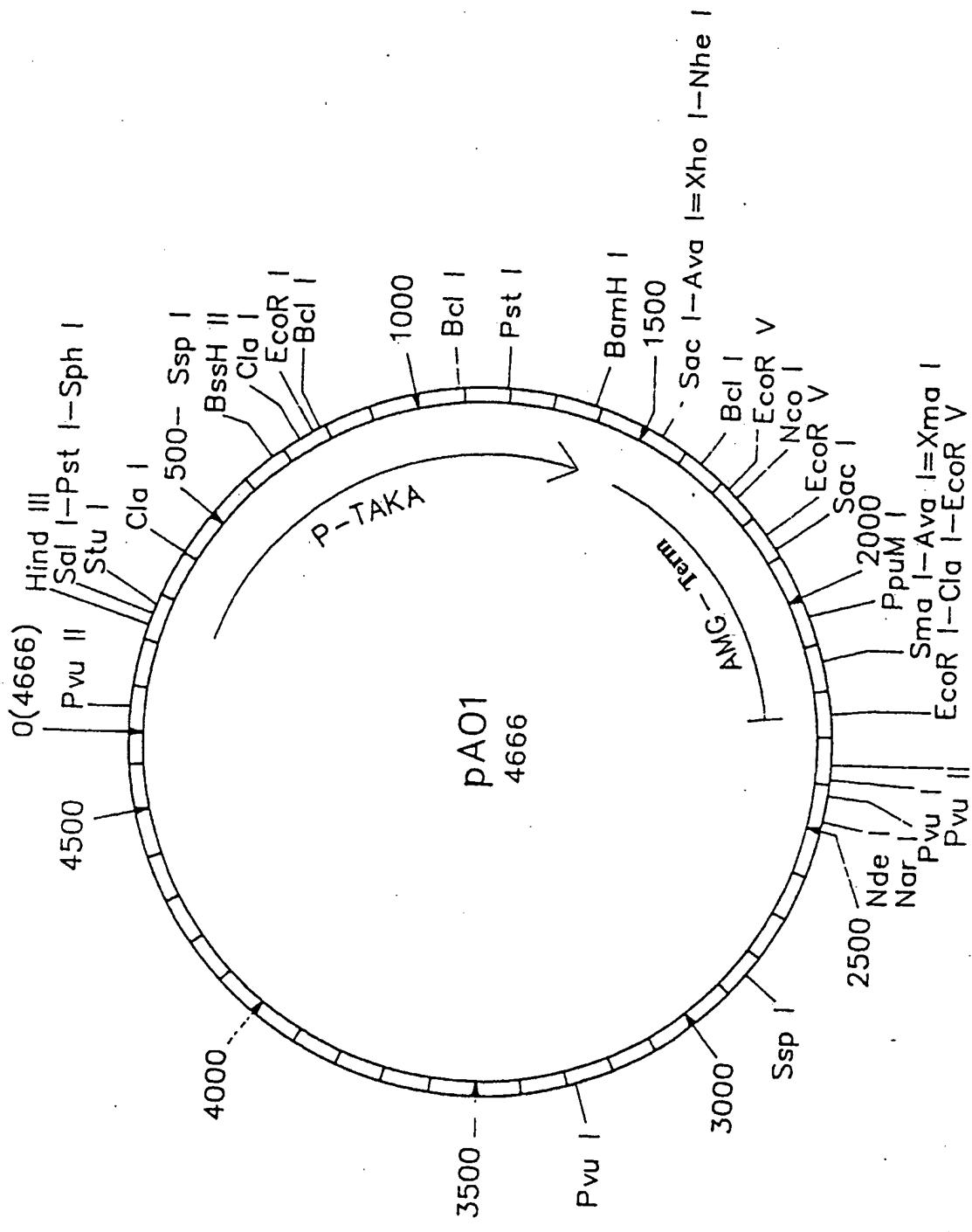


Fig. 5

8/9

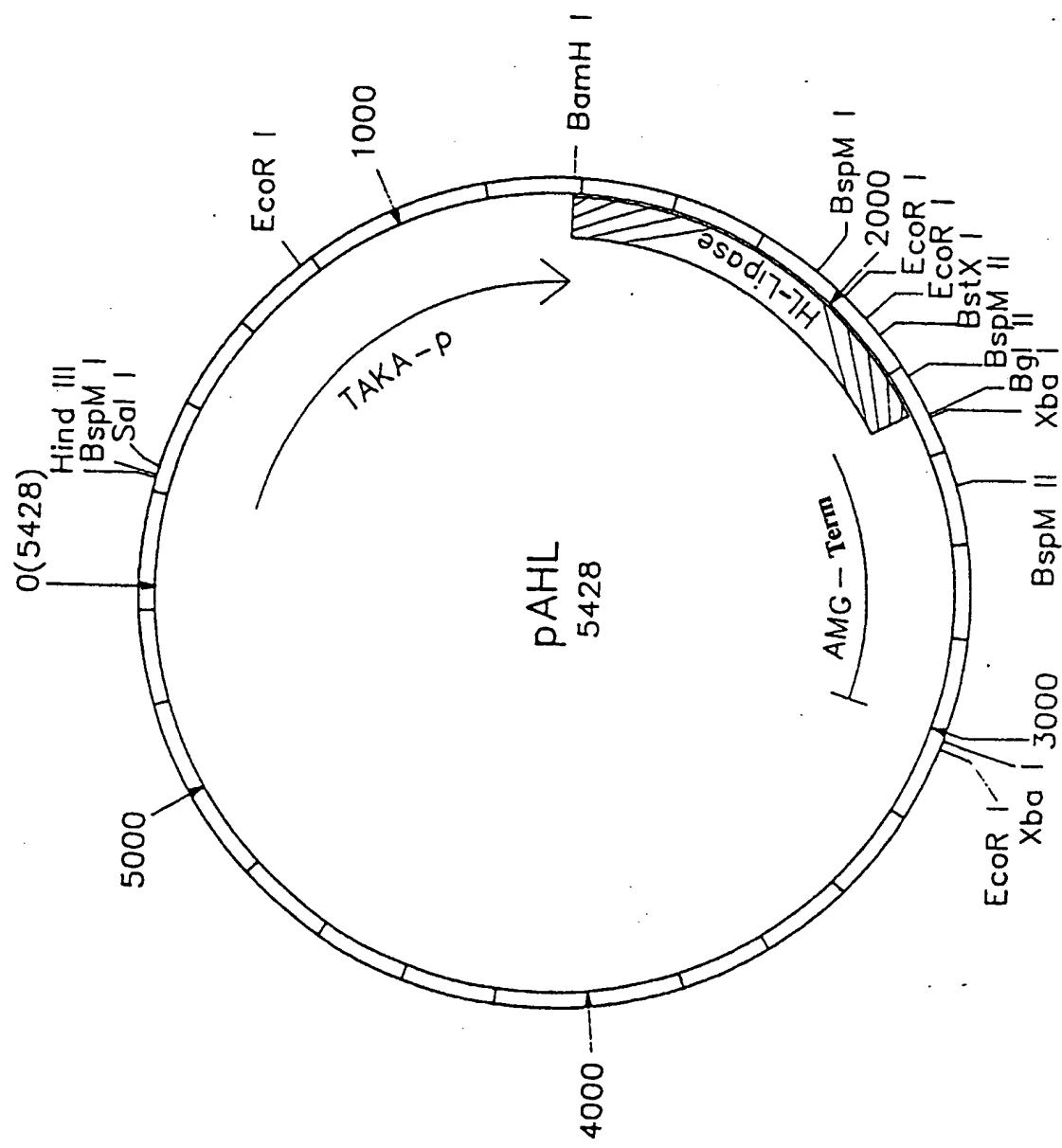


Fig. 6

9/9

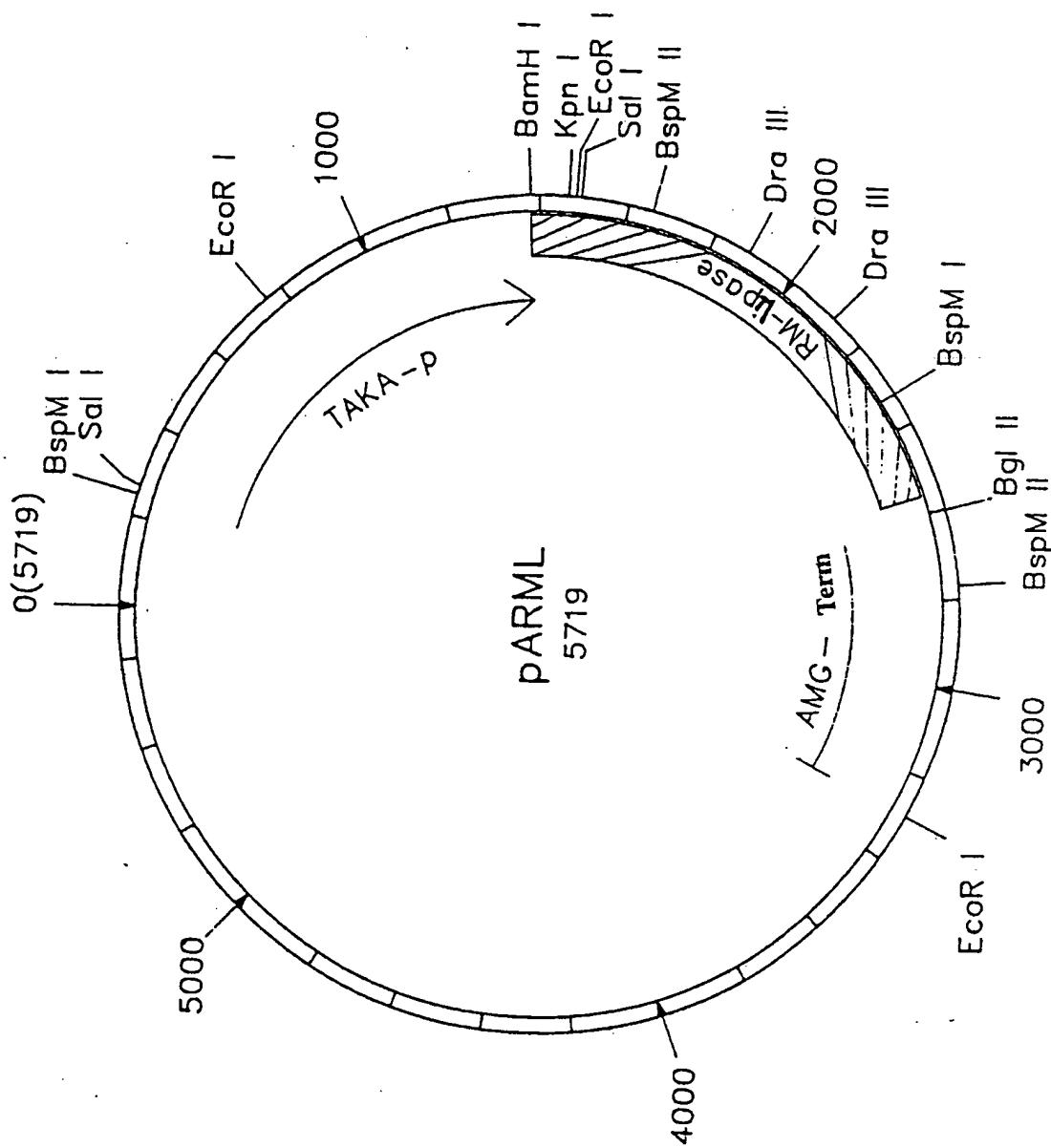


Fig. 7